Multiplizität der Serin-spezifischen Transfer-Ribonucleinsäuren aus Brauer- und Bäckerhefe

Joachim Kruppa

1972

Multiplizität der Serin-spezifischen Transfer-Ribonucleinsäuren aus Brauer- und Bäckerhefe

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Joachim Kruppa
aus Kranzdorf

München 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 7.6.1972

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München in der Zeit von September 1967 bis September 1971 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich vielmals für die Förderung dieser Arbeit. Den Kollegen der Abteilung danke ich für anregende Diskussionen.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

J. Kruppa und H.G. Zachau,
Biochim. Biophys. Acta (im Druck)

F. Fittler, J. Kruppa und H.G. Zachau,
Biochim. Biophys. Acta (im Druck)

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Ergebnisse	6
2.1.	Multiplizität der Serin tRNAs aus Brauerhefe	6
2.1.1.	Anreicherung und Analyse von $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$	7
2.1.2.	Anreicherung und Analyse von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$	12
2.1.3.	Versuche zur Trennung von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$	16
2.1.4.	Anreicherung und Analyse von $tRNA^{Ser}_{3a}$	22
2.1.5.	Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{3b}$	25
2.2.	Multiplizität der Serin tRNAs aus Bäckerhefe	27
2.2.1.	Anreicherung und Analyse von $tRNA^{Ser}_{2}$	27
2.2.2.	Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{3a}$	33
2.2.2.1.	Versuche zur Derivatisierung von Seryl-tRNA	33
2.2.2.2.	Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{3a}$ durch Chromatographie an Ionenaustauschern	36
2.3.	Bestimmung des N^4-Acetylcytidingehaltes und Entacetylierung von Serin tRNA	38
2.4.	Verhalten der Serin tRNAs in den angewandten Trennmethoden	43
2.4.1.	Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen	43

		Seite
2.4.2.	Gegenstromverteilungen im Tri-n-butylamin-System	45
2.4.3.	Gegenstromverteilungen im Ammoniumsulfat-System und Isopropanol-Phosphat-System	47
2.4.4.	Chromatographie an RPC-4-Säulen	49
2.4.5.	Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen in 7 M Harnstoffpuffer	52
2.5.	Kinetische Untersuchung der Aminoacylierungs-reaktion von Serin tRNAs	57
2.6.	Ribosomenbindungstest der Seryl-tRNAs	59
2.7.	$tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung der geklonten Hefe-stämme	61
2.8.	$tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung der Bäckerhefe nach Sporulation	63
3.	Diskussion	65
4.	Experimenteller Teil	69
4.1.	Materialien	69
4.1.1.	tRNAs, Nucleotide	69
4.1.2.	Enzyme	69
4.1.3.	Adsorbentien für Säulenchromatographie	70
4.1.4.	Reagentien	71

		Seite
4.2.	Apparative Hilfsmittel	71
4.3.	Methoden	72
4.3.1.	Vorbereitung von Ionenaustauschern	72
4.3.2.	Chromatographie von aminoacylierten tRNAs an BD-Cellulose	73
4.3.3.	Chromatographie von Seryl-tRNAs an MASA-Säulen	74
4.3.4.	Gelfiltration an Sephadex G-100 und G-25	75
4.3.5.	tRNA-Fraktionierung mit Gegenstromverteilungen	75
4.3.6.	Derivatisierung von Seryl-tRNA	76
4.3.7.	Präparative Entacetylierung und analytische Bestimmung des Acetylgehalts von Serin tRNA	77
4.3.8.	Bestimmung der Endgruppe von Seryl-tRNA nach T1-RNase-Spaltung	78
4.3.9.	Oligonucleotidanalyse	79
4.3.10.	Disk-Elektrophorese	81
4.3.11.	Aminoacylierung von tRNA	81
4.3.12.	Ribosomenbindungstest	84
4.3.13.	Klon-Isolierung und Anzucht von größeren Hefemengen	84
4.3.14.	Sporulation und Tetradenanalyse	85

		Seite
4.3.15.	Isolierung von tRNA aus Hefe	86
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	87
6.	Literaturverzeichnis	89
7.	Abkürzungsverzeichnis	95

1. Einleitung und Problemstellung

Nucleotidsequenzen der Desoxyribonucleinsäure (DNA) enthalten die genetische Information für die Aminosäuresequenzen der Proteine (1). Die Übertragung dieser Information erfolgt in zwei Schritten. Im Zellkern wird zunächst an einem Strang der DNA eine komplementäre Matrizen-RNA (mRNA) synthetisiert (Transcription) (2). Die mRNA wandert dann ins Cytoplasma und assoziiert dort mit Ribosomen. Drei aufeinanderfolgende Nucleotide der mRNA bilden ein Codon (3), das einer der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren entspricht. Die Nucleotidsequenz der mRNA wird von den entstandenen Polysomen mit Hilfe aminoacylierter Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNAs) in die entsprechende Aminosäuresequenz "übersetzt" (Translation) (4 - 6). Die tRNAs üben während der Proteinbiosynthese auf Grund ihrer Struktur zwei Funktionen aus:

a) Sie akzeptieren selektiv nur eine bestimmte Aminosäure, die von einer spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetase über eine Esterbindung an das C-C-A-Ende angelagert wird.

b) Die Aminoacyl-tRNA assoziiert mit dem mRNA-Ribosomen-Komplex, dabei tritt das Anticodon der tRNA mit dem entsprechenden Codon der mRNA in Wechselwirkung. Anschließend wird die Aminosäure mit der wachsenden Peptidkette verbunden.

Die Untersuchungen an tRNAs haben zum Verständnis der molekularen Wechselbeziehungen in der Proteinbiosynthese einen wesentlichen Beitrag geliefert. Da die tRNAs mit den heutigen experimentellen Methoden einer Analyse leicht zugänglich sind, besteht die Hoffnung, daß mit ihrer Hilfe weitere Probleme, z.B. der Regulation (7, 8) und der spezifischen Erkennungsregionen (6, 9), aufgeklärt werden können. Im Hinblick auf die offenen Fragen erscheint die Untersuchung der Multiplizität von tRNAs, wie die folgenden Beispiele zeigen, interessant und lohnend zu sein. Mit Multiplizität bezeichnet man das Auftreten mehrerer strukturell verschiedener tRNA-Spezies, die von der gleichen Aminosäure be-

laden werden können. Es wurden verschiedene Formen der Multiplizität beobachtet:

a) Ein Teil der multiplen tRNAs, die in jedem Organismus gefunden werden, ist durch die Degeneration des genetischen Codes bedingt. Da den 20 Aminosäuren 61 Trinucleotide entsprechen (3), gibt es für viele Aminosäuren mehrere Codons, die auf Grund der Basenspezifität zwischen Codon und Anticodon nicht durch eine einzige sondern durch mehrere tRNAs übersetzt werden müssen.

b) Eine spezielle Form der Multiplizität beruht auf den sogenannten Stopp-Codons: U-A-A, U-A-G und U-G-A, die im Normalfall zum Abbruch der wachsenden Proteinkette führen (1, 3). In E. coli (10, 11) und Hefe (12) wurden verschiedene Suppressor-tRNAs gefunden, die diese drei Codons ablesen können.

c) Eine Form der Multiplizität, die nicht durch Codons bedingt war, wurde zuerst bei $tRNA^{Ser}$ in Brauerhefe beobachtet (13). Diese Hefe enthält zwei Serin tRNAs, deren Sequenzen sich durch drei Nucleotidaustausche außerhalb des Anticodons unterscheiden (Abb. 1). Auch bei verschiedenen tRNAs aus E. coli (14, 15) wurde diese Form der Muliplizität gefunden.

d) Die Multiplizität der tRNAs ist abhängig von den Wachstumsbedingungen der Zellen. Unvollständig methylierte tRNAs aus E. coli (16, 17), die bei Methioninmangel im Nährmedium entstehen, fanden reges Interesse, da angenommen wurde, daß die Methylgruppen für die Stabilisierung der biologisch aktiven Konformation und für die tRNA-Funktion wichtig sind. Läßt man E. coli ohne Fe^{3+}-Ionen wachsen, so treten bei einigen tRNAs, z.B. $tRNA^{Phe}$ (18) Veränderungen auf. Das Vorkommen von Adenosin an Stelle von Isopentenyladenosin in $tRNA^{Tyr}$ (E. coli) wurde ebenfalls auf Wachstumsbedingungen zurückgeführt (19).

e) Zellorganellen besitzen eigene, spezielle tRNAs, die sich von den cytoplasmatischen unterscheiden, wie bei Mitochondrien aus Neurospora crassa (20, 21), Hefe (22), Tetrahymena (23), Rattenleber (24) und HeLa-Zellen (25) nachgewiesen werden konnte. Es wurde gezeigt, daß diese tRNAs mit der mitochondrialen DNA hybridisieren (26, 27). In den Chloroplasten wurden eben-

falls spezielle tRNAs gefunden (28, 29), die mit der DNA aus Chloroplasten hybridisierten (30).

f) Die tRNA-Multiplizität von verschiedenen Entwicklungsstadien (31) einiger Organismen wurde mit chromatographischen Methoden untersucht und verglichen. Unterschiede in der embryonalen und adulten tRNA-Zusammensetzung (32) wurden beobachtet. Höhere Organismen können in verschiedenen Organen eine unterschiedliche tRNA-Zusammensetzung besitzen (33).

g) Die Multiplizität der tRNAs kann nach Phagen- oder Virusinfektionen nach zwei Mechanismen verändert sein, entweder wird vorhandene Wirts-tRNA modifiziert (34) oder es entstehen neue tRNAs, deren genetische Information aus dem Phagen- (35, 36) bzw. Virengenom (37) stammt.

h) Unterschiede in der Multiplizität wurden bei chromatographischen Vergleichen der tRNAs aus gesunden und Tumorgeweben, z.B. bei Leber und Hepatom (38) gefunden.

i) Spezielle tRNAs sind an der Zellwandsynthese von grampositiven und gramnegativen Bakterien beteiligt (39). Auch der Aminosäureeinbau in Phosphatidylglycerin erfolgt über besondere tRNAs (40).

Viele der erwähnten Formen der Multiplizität wurden mit chromatographischen Methoden nachgewiesen. In unfraktionierter tRNA aus E. coli wurden auf diese Weise 56 tRNA-Gipfel (41) gefunden. Bei der Chromatographie an BD-Cellulose in 7 M Harnstoffpuffer (vgl. 2.4.5.) wurden 45 tRNA-Komponenten beobachtet. Bei der Interpretation von tRNA-Profilen sind mehrere Fehlerquellen zu beachten, entweder ist die Anzahl der tRNA-Gipfel zu niedrig, da einige isoakzeptierende tRNAs zu geringe strukturelle Unterschiede aufweisen (vgl. 2.1.2.), oder die Anzahl der tRNA-Gipfel ist zu hoch, da Aggregate (42), verschiedene Konformationen (43) oder Unterschiede im 3'-Ende (44) einen höheren Grad der Multiplizität vortäuschen.

Untersuchungen der Multiplizität von Serin tRNAs sind an mehreren Organismen (45 - 47) durchgeführt worden, u.a. an Mitochondrien aus Hefe (51). In der vorliegenden Arbeit werden vier Gründe für

die Multiplizität der Serin tRNAs aus Bäcker- und Brauerhefe untersucht:

1. Die Anzahl der multiplen Serin tRNAs kann durch die sechs Serin-Codons bedingt sein, zu deren Übersetzung auf Grund der Wobble-Hypothese (52) mindestens drei Serin tRNAs notwendig sind. Die Codons U-C-U, U-C-C und U-C-A können durch die in ihrer Sequenz bekannten Hauptkomponenten $tRNA_1^{Ser}$ (Brauerhefe) und $tRNA_2^{Ser}$ (Bäcker- und Brauerhefe), die das Anticodon I-G-A besitzen, übersetzt werden (13, 53). Für die Erkennung des Codons U-C-G ist eine zweite und für die Übersetzung der Codons A-G-U und A-G-C eine dritte Serin tRNA erforderlich. Es wurde vermutet, daß diese beiden, bisher unbekannten $tRNA^{Ser}$-Spezies in den zusätzlichen $tRNA^{Ser}$-Gipfeln enthalten sind, die bei den Fraktionierungen der $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten beobachtet wurden (48 - 50). Diese $tRNA^{Ser}$-Fraktionen sollten angereichert und charakterisiert werden.
2. Die Multiplizität der Serin tRNAs könnte auf die Zusammensetzung der Hefen zurückzuführen sein, z.B. könnten $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$ aus zwei verschiedenen Hefestämmen, die in der Brauerhefe etwa zu gleichen Teilen enthalten sind, stammen (54). Diese Möglichkeit sollte durch Untersuchung der $tRNA^{Ser}$-Fraktionen von geklonten Hefen geklärt werden.
3. Die Multiplizität der Serin tRNAs könnte vom Polyploidiegrad der Hefezellen (55) abhängen. Dieses Problem sollte nach der Sporulation der geklonten Hefestämme untersucht werden.
4. Die Multiplizität der Serin tRNAs könnte auf die Wachstumsbedingungen der Hefezellen zurückzuführen sein. Der N^4-Acetylcytidingehalt der $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten aus nicht geklonter und geklonter Hefe sollte verglichen werden. Eine einfache Methode zur Bestimmung von N^4-Acetylcytidin in den $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten sollte ausgearbeitet werden. Schließlich sollte die Trennung der vier Hauptkomponenten der Brauerhefe: $tRNA_1^{Ser}$, $tRNA_{1(-ac)}^{Ser}$, $tRNA_2^{Ser}$ und $tRNA_{2(-ac)}^{Ser}$ versucht werden (Abb. 1).

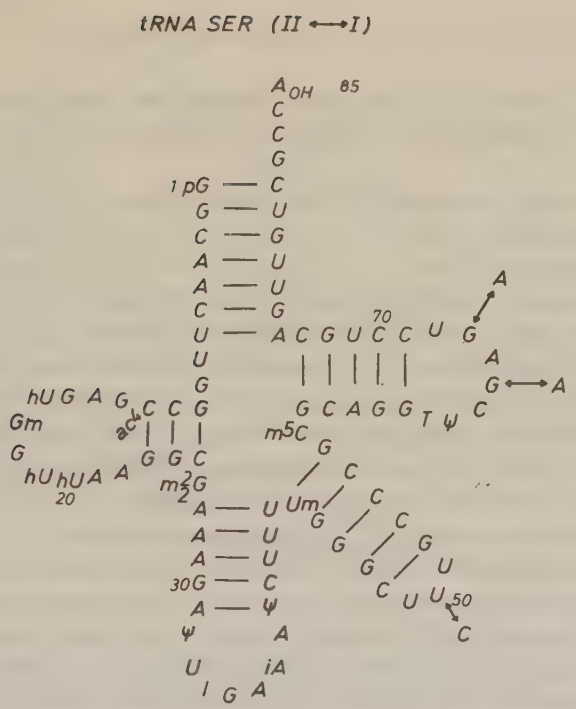

Abb. 1. Kleeblattmodell von $tRNA_2^{Ser} \longleftrightarrow tRNA_1^{Ser}$ aus Brauerhefe (13).

2. Ergebnisse

2.1. Multiplizität der Serin tRNAs aus Brauerhefe

Die Fraktionierung und Charakterisierung der Serin tRNAs gelang durch Anwendung verschiedener chromatographischer Trennmethoden.
Bei Gegenstromverteilungen im Tri-n-butylamin-System (56) wird das Butylamin-Salz der tRNA verteilt. Die Verteilungskoeffizienten der tRNAs können durch den Di-n-butyläthergehalt des Lösungsmittelsystems beeinflußt werden. Dieses System eignet sich zur Fraktionierung sehr großer tRNA-Mengen.
Bei Gegenstromverteilungen im Ammoniumsulfat-System (57) und Isopropanol-Phosphat-System (58) wird die tRNA durch den hohen Salzgehalt der wäßrigen Phase in die organische Phase gedrängt. In beiden Lösungsmittelsystemen können nur geringe tRNA-Mengen aufgelöst werden, deswegen werden in diese Verteilungen angereicherte $tRNA^{Ser}$-Fraktionen eingesetzt.
Die Fraktionierung von tRNAs an benzoylierten DEAE-Cellulose-Säulen (BD-Cellulose-Säulen) erfolgt nach Ladungsunterschieden. Die Trennung wird zusätzlich durch hydrophobe Wechselwirkungen, die sich zwischen den Nucleotiden der tRNAs und den Benzoylresten der Austauschermatrix ausbilden können, beeinflußt (59).
DEAE-Sephadex-Säulen sind Ionenaustauscher, die ein tRNA-Gemisch zusätzlich nach Molekülgröße trennen können (60, 61).
RPC-3- und RPC-4-Säulen fraktionieren ein tRNA-Gemisch nach Ladungs- und Löslichkeitsunterschieden (62).
An Ionenaustauschersäulen aus DEAE-Cellulose wurden vor allem Oligonucleotidgemische chromatographiert (13, 63).

Chromatographiert man unfraktionierte tRNA aus Brauerhefe, die mit Serin beladen ist, an BD-Cellulose-Säulen, so beobachtet man vier $tRNA^{Ser}$-Gipfel (Abb. 2). Die Position von $tRNA^{Ser}_x$, die in $tRNA^{Ser}$-Fraktionen aus Gegenstromverteilungen gefunden wurde, ist im Elutionsprofil zusätzlich eingezeichnet. Die Benennung der verschiedenen $tRNA^{Ser}$-Gipfel erfolgt auf Grund der in ihnen ge-

fundenen $tRNA^{Ser}$-Spezies.

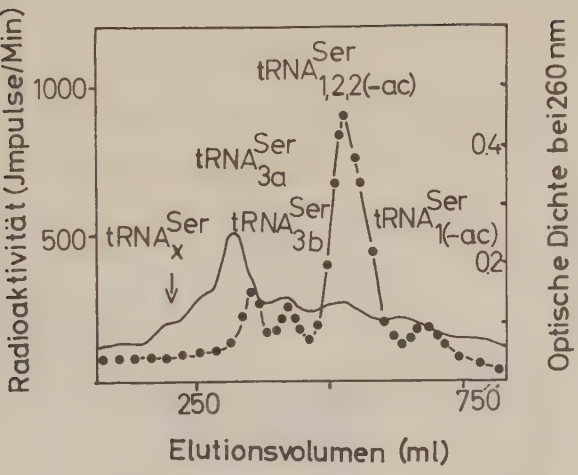

Abb. 2. Elutionsprofil einer BD-Cellulose-Säule (vgl. 4.3.2.) von unfraktionierter, mit ^{14}C-Serin beladener tRNA aus Brauerhefe. (——) Optische Dichte, (●—●) Radioaktivität.

2.1.1. Anreicherung und Analyse von $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$

$tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$-Fraktionen von mehreren BD-Cellulose-Säulen, die als "Hauptverunreinigungen" $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ und $tRNA^{Tyr}$ enthielten, wurden vereinigt und mit Gegenstromverteilungen angereichert (Abb. 3). Ein großer Teil von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ (Fraktion I, Abb. 3 a) konnte durch die Gegenstromverteilung im Butylamin-System abgetrennt werden (vgl. 2.4.2.). Die Abtrennung von $tRNA^{Tyr}$ und der restlichen $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Menge gelang mit der Gegenstromverteilung im Ammoniumsulfat-System (Abb. 3 b).

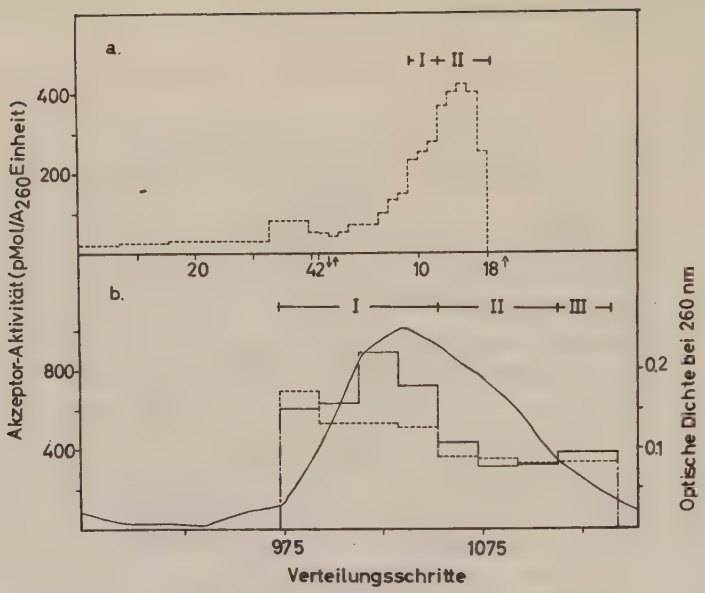

Abb. 3. Profile der Gegenstromverteilungen von $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$.

a) $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$-Fraktionen von mehreren präparativen BD-Cellulose-Säulen (z.B. Fraktion II, Abb. 6 c) wurden vereinigt (1.58 g) und mit einer Gegenstromverteilung im Butylamin-System (56) (25.5 Anteile Butyläther pro 100 Anteile Butanol) angereichert. Nach 42 Verteilungsschritten (⇑⇓) wurden 18 Oberphasen einzeln entnommen (⇑).

b) Fraktion II der Verteilung a) (6 600 A_{260}-Einheiten tRNA) wurde mit einer Gegenstromverteilung im Ammoniumsulfat-System (57) weiter angereichert. Nach 650 Verteilungsschritten wurden die Seitenfraktionen des tRNA-Gipfels entnommen. Insgesamt wurden 1 176 Verteilungsschritte in der automatischen Apparatur durchgeführt.
(——) Optische Dichte (Kurve), Serin-Akzeptoraktivität vor (---) und nach (——) Erhitzen (2 Min. auf 80 °C in Cacodylatpuffer, pH 7.0 (65)).

Die angereicherte $tRNA^{Ser}$-Fraktion I aus Abb. 3 b besaß eine Serin-Akzeptoraktivität von ungefähr 1 200 pMol/A_{260}-Einheit. Im analytischen Einbau wurden weniger als 5 % Tyrosin tRNA gefunden. In Gelelektrophoresen (64) waren weniger als 5 % tRNA-Bruchstücke vorhanden. Diese Fraktion enthielt 30 % der in die erste Verteilung eingesetzten $tRNA^{Ser}$-Menge.

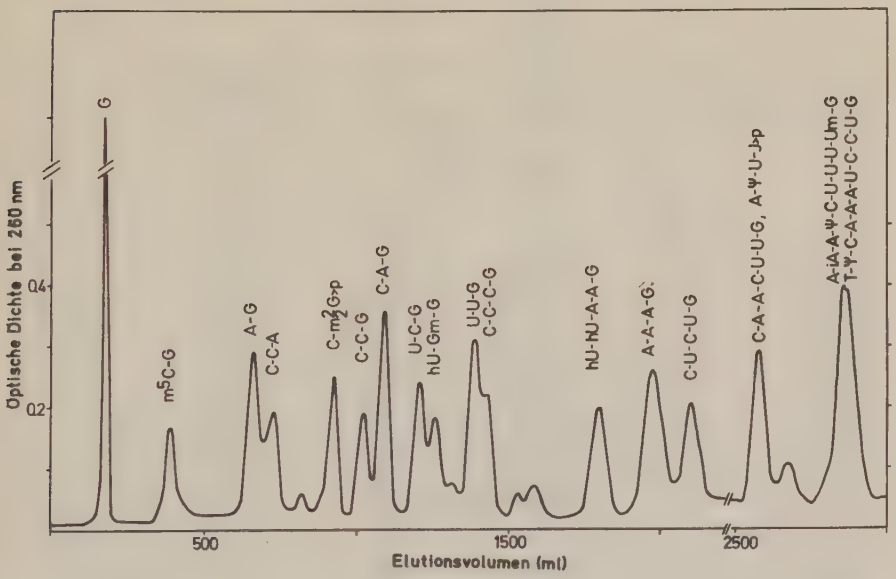

Abb. 4. Elutionsprofil der T1-RNase/PME-Spaltung von $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$. 236 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ (Fraktion I, Abb. 3 b) wurden gespalten und an einer DEAE-Cellulose-Säule (1 x 50 cm), die mit einem Ammoniumcarbonat-Gradienten eluiert wurde, getrennt (vgl. 4.3.9.).
(——) Optische Dichte.

Mit zwei Oligonucleotidanalysen wurde die Reinheit der $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$-Fraktion überprüft (Abb. 4 und 5, Tabelle 1). Unter den Trinucleotiden der T1-RNase/PME-Spaltung wurde 1 Mol C-C-G pro Mol tRNA gefunden, C-ac^4C-G fehlte vollständig (Abb. 4). Bei der photomet-

rischen Bestimmung konnte ebenfalls kein N^4-Acetylcytidin nachgewiesen werden (vgl. 2.3.). Das Oligonucleotidgemisch enthielt kein T-ψ-C-G, wie die Analyse des kleinen Doppelgipfels zwischen C-C-C-G und hU-hU-A-A-G ergab. Im Bereich der Pentanucleotide wurde nur C-U-C-U-G nachgewiesen; U-C-C-U-G und C-U-U-U-G aus $tRNA^{Ser}_{2(+ac)}$ wurden nicht gefunden, d.h. die gespaltene $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$-Fraktion war von den $tRNA^{Ser}_2$-Komponenten vollständig abgetrennt.

Oligonucleotid	R_{Up} (pH 2.7)	nMol	Mol/Mol tRNA
G	0.00		8.1
m^5C-G	0.10	121	1.0
A-G	0.15	176	1.4
C-C-A	-0.24	41	0.4
C-m^2_2G>p	0.66	123	1.0
C-C-G	0.14	93	0.8
C-A-G	0.20	193	1.6
U-C-G	0.35	135	1.1
hU-Gm-G	0.54	84	0.7
U-U-G	0.77	126	1.0
C-C-C-G	0.20	104	0.8
hU-hU-A-A-G	0.71	121	1.0
A-A-A-G	0.21	127	1.0
C-U-C-U-G	0.57	113	0.9
C-A-A-C-U-U-G	0.59	72	0.6
A-ψ-U-I	0.83	83	0.6
A-ψ-U-I>p	1.21		

Tabelle 1. Analyse der T1-RNase/PME-Oligonucleotide von $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ (vgl. 4.3.9.). Bestimmung der Deka- und Undekanucleotidmenge siehe Text.

Ein weiteres Kriterium für die Abtrennung der $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$-Komponente von $tRNA^{Ser}_{2(+ac)}$ ist das Verhältnis von Deka- zu Undekanucleotid. In der T1-RNase-Spaltung (Abb. 5) betrug das Verhältnis

1.0 : 0.9 von A-iA-A-Ψ-C-U-U-U-Um-G zu T-Ψ-C-A-A-A-U-C-C-U-G (Abb. 5). In dieser Analyse wurde ebenfalls 1 Mol C-C-G pro Mol tRNA gefunden. Dieses Trinucleotid war deutlich im Elutionsprofil der DEAE-Cellulose-Säule zwischen U-C-Gp und C-A-Gp zu erkennen.

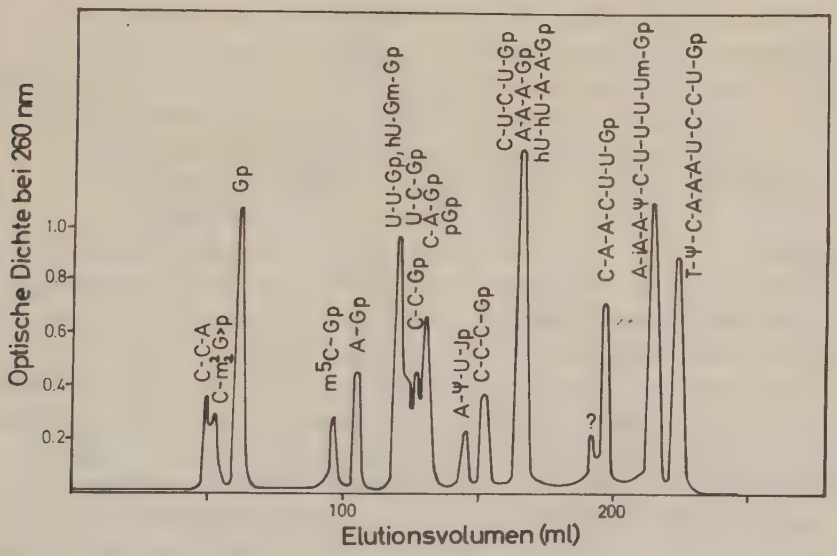

Abb. 5. Elutionsprofil der T1-RNase-Spaltung von $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$. 25 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ (Fraktion I, Abb. 3 b) wurden mit T1-RNase gespalten. Nach Zugabe von Harnstoff (ad 7 M) wurde das Oligonucleotidgemisch an einer DEAE-Cellulose-Säule (0.3 x 100 cm) chromatographiert (vgl. 4.3.9.). (——) Optische Dichte.

Aus beiden Oligonucleotidanalysen geht hervor, daß Fraktion I, Abb. 3 b, nur $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ enthält, d.h. von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ vollständig abgetrennt ist.

2.1.2. Anreicherung und Analyse von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$

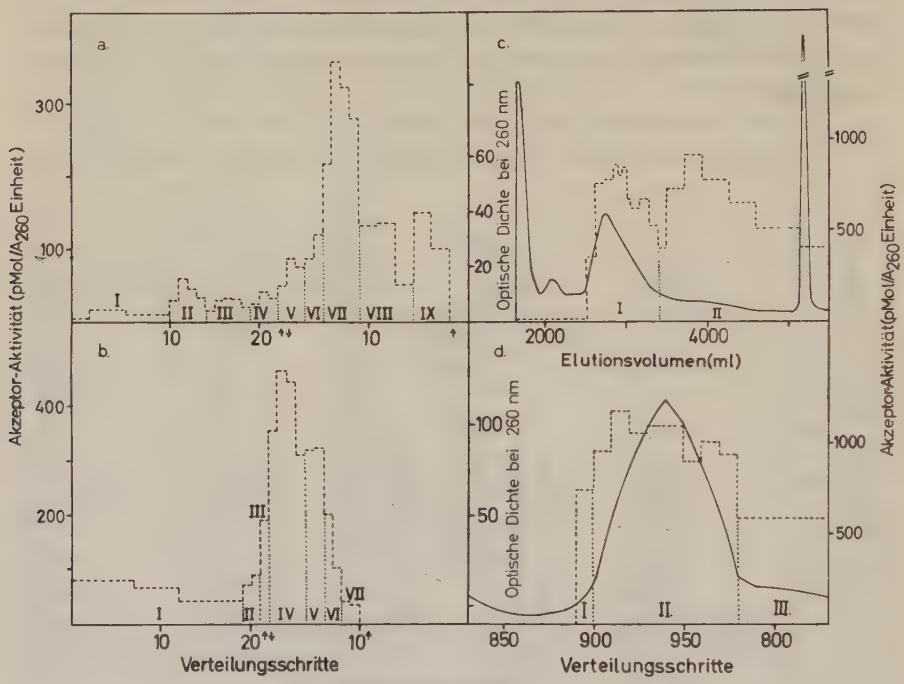

Abb. 6. Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$

a) 65.5 g tRNA aus Brauerhefe wurden mit einer Gegenstromverteilung im Butylamin-System fraktioniert. Die ersten drei Verteilungsschritte wurden mit 30er, alle weiteren mit 24.5er System, durchgeführt (vgl. 4.3.5.). Nach 23 Verteilungsschritten wurden 19 Oberphasen zusätzlich entnommen, Hand-Apparatur mit 23 Verteilungselementen (vgl. 4.2.).

b) 11.2 g tRNA, die Maximumfraktion (VII) aus 6 a und analoge Fraktionen (von H. Feldmann zur Verfügung gestellt), wurden in der oben beschriebenen Apparatur mit einem 26.5er Butylamin-System (vgl. 4.3.5.) verteilt. Nach 23 Verteilungsschritten wurden 10 Oberphasen zusätzlich entnommen.

c) Die Fraktionen IV und V aus 6 b (3 g tRNA) wurden an einer

BD-Cellulose-Säule (4.4 x 100 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten: 0.5 - 1.8 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, je 2 l. Zum Schluß wurde mit einem Gemisch aus Endpuffer und 15 % Äthanol, 2 l, weitereluiert.

d) Fraktion I aus 6 c (13 300 A_{260}-Einheiten tRNA) wurde mit einer Gegenstromverteilung im Ammoniumsulfat-System weitergereinigt. Die erste Entnahme der automatischen Apparatur erfolgte nach 650 Verteilungsschritten. Die Verteilung wurde nach 957 Verteilungsschritten beendet. Die tRNA wurde durch Flotation isoliert (13). (——) Optische Dichte, (---) Serin-Akzeptoraktivität.

Die Fraktionierung von großen tRNA-Mengen (50 - 100 g) wurde mit Gegenstromverteilungen im Butylamin-System durchgeführt. Diese Methode eignet sich zur Abtrennung der $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten aus Hefe (13, 56). Die erste Verteilung ergab eine 6fache Anreicherung der $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten (Abb. 6 a), während die zweite Verteilung im gleichen Lösungsmittelsystem nur eine geringe Zunahme der Serin-Akzeptoraktivität brachte (Abb. 6 b). In 2.4.2. wird die $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung der einzelnen Verteilungsfraktionen durch Chromatographie an analytischen BD-Cellulose-Säulen bestimmt. Die Chromatographie der FraktionIV,V, Abb. 6 b, an der BD-Cellulose-Säule (Abb. 6 c) ergab einen Anstieg der Serin-Akzeptoraktivität auf den doppelten Wert. Nach diesem Reinigungsschritt war $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ (Fraktion II, Abb. 6 c) von der $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Hauptmenge (Fraktion I, Abb. 6 c) abgetrennt. Das Dreikomponentengemisch $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ wurde mit einer Gegenstromverteilung im Ammoniumsulfat-System weiterfraktioniert (Abb. 6 d). Nach dieser Verteilung war die Serin-Akzeptoraktivität nur sehr gering angestiegen, obwohl ein großer Teil der Verunreinigungen, wie Oligonucleotidanalysen zeigten, durch die Verteilung abgetrennt worden war. Der niedrige Wert der Serin-Akzeptoraktivität beruhte sehr wahrscheinlich auf Spuren von Cetavlon, die bei der Isolierung der tRNA aus dem Lösungsmittelsystem zurückgeblieben waren. Die weitere Anreicherung der $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Fraktion erfolgte durch Chromatographie an RPC-4-Säulen.

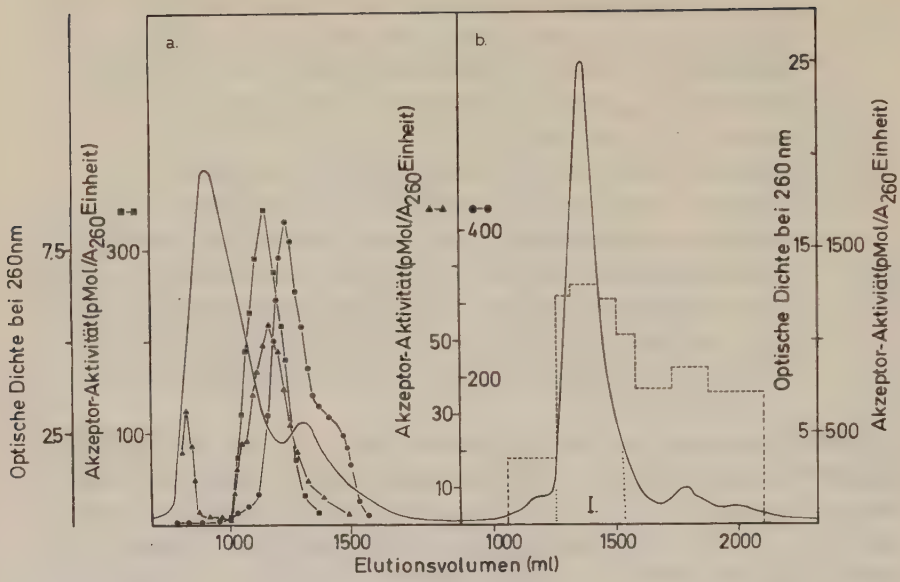

Abb. 7. Elutionsprofile von RPC-4-Säulen (62).

a) Unfraktionierte tRNA aus Brauerhefe (3 500 A_{260}-Einheiten) wurde in 80 ml Ausgangspuffer auf eine RPC-4-Säule (2 x 240 cm) aufgezogen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.45 - 0.8 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 4.5, je 1.5 l. Akzeptoraktivität von Ser (●—●), Tyr (▲—▲) und Phe (■—■).

b) Fraktion II aus Abb. 6 d (5 300 A_{260}-Einheiten tRNA) wurde an einer RPC-4-Säule (2 x 240 cm) chromatographiert. Zuvor wurden durch Erhitzen die $tRNA^{Ser}$-Aggregate dieser Fraktion zerstört: Die tRNA wurde in 0.2 M NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA und 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 6.0 gelöst (550 A_{260}-Einheiten/ml), 1 Min. auf 75 °C erhitzt und im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurde die Salzkonzentration auf 0.45 M NaCl und der pH-Wert auf 4.5 eingestellt. Elutionsbedingungen wie in a.
(——) Optische Dichte, (---) Serin-Akzeptoraktivität.

In einem Vorversuch wurde das Elutionsmuster von $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Tyr}$ und $tRNA^{Phe}$ bestimmt (Abb. 7 a). $tRNA^{Ser}$ war nach dieser Chromatographie gut angereichert, jedoch schlecht von $tRNA^{Tyr}$ und $tRNA^{Phe}$ abgetrennt. Die Verwendung dieser Methode auf einem frühen Stadium der $tRNA^{Ser}$-Anreicherung dürfte gegenüber der Chromatographie an BD-Cellulose kaum Vorteile bringen. Die Chromatographie der angereicherten $tRNA^{Ser}$-Fraktion II, Abb. 6 d, ergab eine Steigerung der Serin-Akzeptoraktivität auf 1 250 - 1 300 pMol/A_{260}-Einheit (Fraktion I, Abb. 7 b). Diese $tRNA^{Ser}$-Fraktion wurde mit T1-RNase gespalten (Abb. 8).

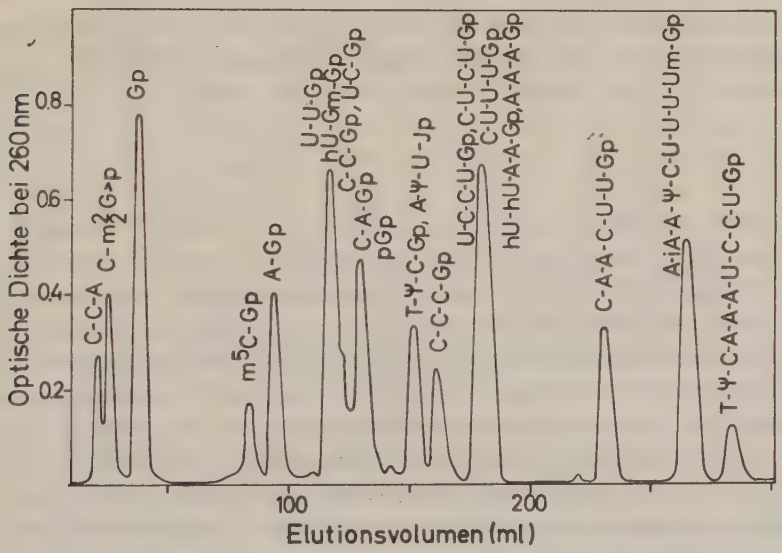

Abb. 8. Oligonucleotidprofil der T1-RNase-Spaltung von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$. 23 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I, Abb. 7 b) wurden mit T1-RNase inkubiert. Nach Zugabe von Harnstoff (ad 7 M) wurden die Oligonucleotide an einer DEAE-Cellulose-Säule (0.3 x 100 cm) getrennt (vgl. 4.3.9.).
(——) Optische Dichte.

Die T1-RNase/PME-Spaltung von $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$ ergab das gleiche Oligonucleotidmuster wie Abb. 2 c in (13), deswegen wurde auf die Darstellung verzichtet. In den Analysen wurden 0.5 - 0.6 Mol C-ac^{4}C-G pro Mol tRNA und etwa 0.4 Mol C-C-G gefunden, d.h. das Gemisch $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$ enthält etwa 40 % $tRNA^{Ser}_{2\,(-ac)}$. Die Menge der vollständig acetylierten $tRNA^{Ser}_1$ kann man aus dem letzten Gipfel des Elutionsprofiles (Abb. 8) berechnen, denn nur die $tRNA^{Ser}_1$-Komponente enthält außer dem Dekanucleotid noch zusätzlich das Undekanucleotid T-Ψ-C-A-A-A-U-C-C-U-Gp. Der Größenvergleich der beiden letzten Gipfel ergibt 30 - 35 % vollständig acetylierte $tRNA^{Ser}_1$. Für die vollständig acetylierte $tRNA^{Ser}_2$ erhält man nach Abzug der obigen Werte etwa 25 %.
Aus den Untersuchungen des Abschnitts 2.3. resultiert eine Analysenmethode, mit der man die Zusammensetzung von $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$ schneller und mit weniger Aufwand bestimmen kann.

2.1.3. Versuche zur Trennung von $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$

Die Ausführung der Trennung des Gemisches aus $tRNA^{Ser}_1$, $tRNA^{Ser}_2$ und $tRNA^{Ser}_{2\,(-ac)}$ stößt auf Schwierigkeiten, da zwischen den einzelnen Komponenten nur geringe Ladungsunterschiede und geringe Löslichkeitsunterschiede bestehen. Die Löslichkeitsunterschiede haben in Gegenstromverteilungen im Ammoniumsulfat-System zu einer teilweisen Trennung der $tRNA^{Ser}_1$- und $tRNA^{Ser}_2$-Komponenten geführt (13). Die geringen Ladungsunterschiede resultieren aus den drei Nucleotidaustauschen zwischen $tRNA^{Ser}_1$ und $tRNA^{Ser}_2$ (Abb. 1). Bei pH 3.0 sollte der Ladungsunterschied am größten sein, denn dieser pH-Wert liegt in der Mitte der pK-Werte (66) von den beiden Adenosin- (pK 3.6) und Guanosin-Resten (pK 2.3). Unter diesen pH-Bedingungen ist der Cytidinrest in $tRNA^{Ser}_1$ positiv geladen, während der Uridinrest in $tRNA^{Ser}_2$ keine Ladung trägt. Auf Grund dieser Überlegungen wurde zunächst eine Ionenaustauscherchromatographie durchgeführt. $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$ wurde an einer DEAE-Sephadex-A-25-Säule chromatographiert, die mit einem Formiatpuffer, pH 3.1, eluiert wurde (Abb. 9 a). Die monomolekulare $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$-Fraktion (Abb. 9 b) ergab nach der Chromatographie zwei Fraktionen, die beide $tRNA^{Ser}$-Aggregate enthielten (Abb. 9 c, d).

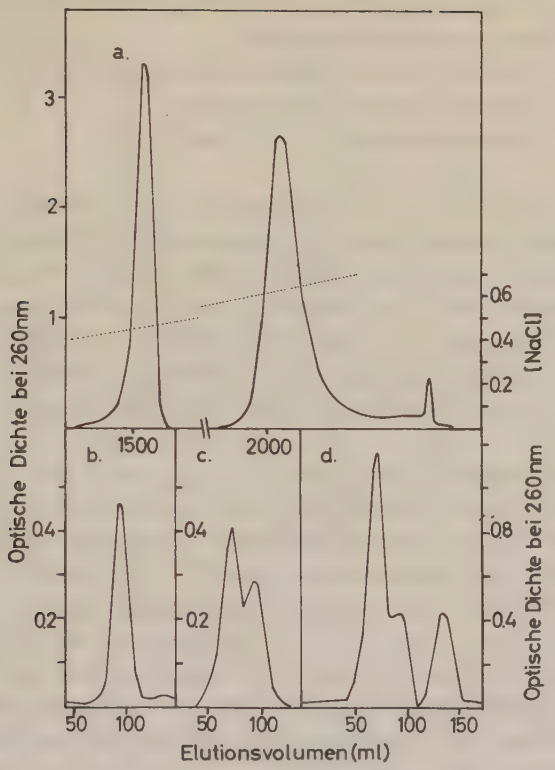

Abb. 9. Trennversuch von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$.

a) 480 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I, Abb. 7 b) in 50 ml Ausgangspuffer wurden an einer DEAE-Sephadex-A-25-Säule (1.4 x 150 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit zwei Gradienten: 0.25 - 0.6 M NaCl, 10 mM Ammoniumformiat, pH 3.1, je 1 l. Dieser Gradient wurde nach 1 600 ml ersetzt durch 0.5 - 1.2 M NaCl, 10 mM Ammoniumformiat, pH 3.1, je 1 l.

b) 10 A_{260}-Einheiten Start-tRNA aus 9 a wurden an einer Sephadex-G-100-Säule (1 x 150 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit einem Cacodylatpuffer, pH 5.5, bei 4 °C (65).

c) 8 A_{260}-Einheiten tRNA des ersten Gipfels aus 9 a wurden wie in 9 b chromatographiert.

d) 8 A_{260}-Einheiten tRNA des zweiten Gipfels aus 9 a wurden wie in 9 b chromatographiert.

(——) Optische Dichte, (••••) NaCl .

Die Vermutung, daß es sich um Aggregate verschiedener $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung handeln könnte, konnte durch T1-RNase-Spaltungen beider Fraktionen nicht bestätigt werden, denn beide Oligonucleotidanalysen ergaben das gleiche Verhältnis von Deka- zu Undekanucleotid, d.h. das Verhältnis von $tRNA_1^{Ser}$ zu $tRNA_{2,2(-ac)}^{Ser}$ hatte sich durch die Chromatographie nicht geändert. Anscheinend ist die beobachtete Trennung auf verschiedene Konformationen der Aggregate zurückzuführen.

Der zweite Trennversuch von $tRNA_{1,2,2(-ac)}^{Ser}$ wurde mit Seitenfraktionen einer Gegenstromverteilung im Ammoniumsulfat-System (Fraktion I und III, Abb. 6 d) durchgeführt, denn diese Fraktionen sollten bereits unterschiedliche $tRNA_1^{Ser}$- und $tRNA_2^{Ser}$-Mengen enthalten (13). Beide Fraktionen wurden zunächst an RPC-4-Säulen weiter angereichert (Abb. 10 a, c) und dann an BD-Cellulose-Säulen chromatographiert (Abb. 10 b, d). Im Eluat der RPC-4-Säule, Abb. 10 c, (Fraktion I) wurde eine bisher unbekannte Komponente $tRNA_x^{Ser}$ gefunden. Der Elutionspuffer der BD-Cellulose-Säulen enthielt 7 M Harnstoff, um die Bildung von Aggregaten, die bei pH 3.0 leicht entstehen (vgl. Abb. 9 a), zu verhindern. Diese Art der Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal zur präparativen Fraktionierung von tRNA verwendet, deshalb ist die Bilanz einer Anreicherung (Abb. 10 d) als Beispiel in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Zusammensetzung der $tRNA^{Ser}$-Fraktionen (Abb. 10 b, d) wurde durch Chromatographie an analytischen BD-Cellulose-Säulen ermittelt (Abb. 11 und Tabelle 3). Aus den Abbildungen 11 c und d geht hervor, daß die Fraktion III, Abb. 10 d, nur vollständig acetylierte $tRNA_2^{Ser}$ enthält (vgl. 2.3.). Dieses Ergebnis wurde durch eine T1-RNase-Spaltung, die das gleiche Oligonucleotidmuster wie Abb. 19 ergab, und durch die N^4-Acetylcytidin-Bestimmung bestätigt. Die Auftrennung von $tRNA_{1,2(-ac)}^{Ser}$ (Fraktion I, Abb. 10 d) ist bisher nicht gelungen.

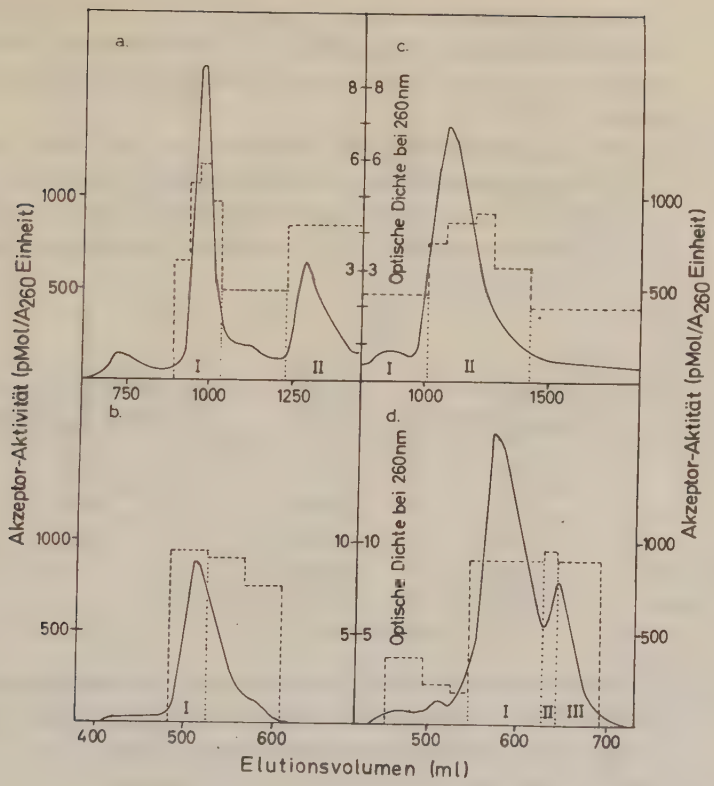

Abb. 10. Chromatographische Trennung von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$.

a) 1 900 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I, Abb. 6 d) wurden desaggregiert (vgl. Abb. 7 b) und an einer RPC-4-Säule (1 x 240 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.45 - 0.8 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 4.5, je 1 l. Die Chromatographie wurde bei 37 °C ausgeführt.

b) 390 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I aus 10 a) in 5 ml Ausgangspuffer wurden an einer BD-Cellulose-Säule (1 x 75 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.2 - 0.4 M NaCl, 7 M Harnstoff, pH 3.0, je 600 ml.

c) 2 300 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion III, Abb. 6 d) wurden desaggregiert (vgl. Abb. 7 b) und an einer RPC-4-Säule (1.4 x 240 cm) chromatographiert. Elutionsbedingungen wie 10 a.

d) 1 100 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion II aus 10 c) wurden in 5 ml Ausgangspuffer auf eine BD-Cellulose-Säule (1 x 75 cm) aufgezogen. Elutionsbedingungen wie in 10 b. (——) Optische Dichte, (---) Serin-Akzeptoraktivität.

Fraktion	$tRNA^{Ser}$ A_{260}-Einheit	$tRNA^{Ser}$ µMol	Serin-Akzeptoraktivität pMol/A_{260}-Einheit
I	700	0.623	890
II	81	0.075	924
III	60	0.054	904
Gesamteluat	894	0.765	
Start tRNA	1100	0.922	

Tabelle 2. Bilanz einer BD-Cellulose-Säule in 7 M Harnstoffpuffer (Abb. 10 d). Die $tRNA^{Ser}$-Mengen wurden durch Auflösen der äthanolgefällten Fraktionen bestimmt.

Fraktion	$tRNA^{Ser}_1$	$tRNA^{Ser}_2$	$tRNA^{Ser}_{2\,(-ac)}$
I, Abb. 10 b	60	-	40
I, Abb. 10 d	30	-	70
III, Abb. 10 d	-	100	-

Tabelle 3. Relative prozentuale Zusammensetzung der $tRNA^{Ser}$-Fraktionen aus Abb. 10. Die Werte wurden durch Planimetrieren der entsprechenden $tRNA^{Ser}$-Gipfel aus Abb. 11 bestimmt (vgl. 2.3.).

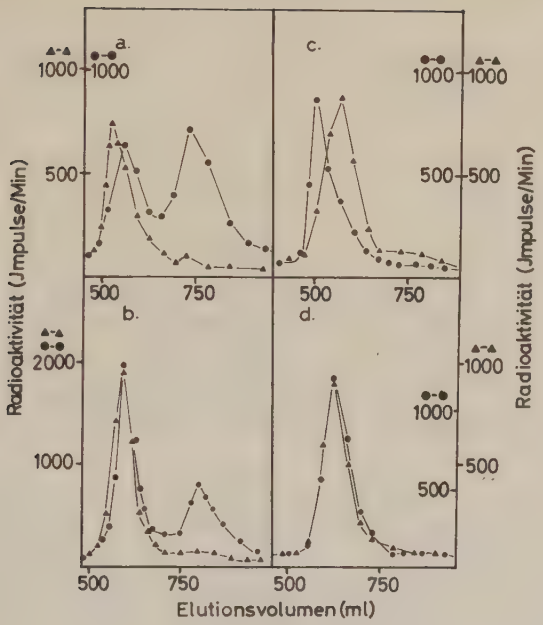

Abb. 11. Elutionsprofile von analytischen BD-Cellulose-Säulen der $tRNA^{Ser}$-Fraktionen aus Abb. 10.

a) Cochromatographie von ^{3}H-Seryl-tRNA und ^{14}C-Seryl-tRNA, die vor der Beladung mit Ammoniak entacetyliert wurde (vgl. 4.3.7.). Beide tRNAs aus Fraktion I, Abb. 10 b.

b) Cochromatographie von Seryl-tRNAs (Fraktion I, Abb. 10 d). Beladung und Behandlung der tRNAs wie in 11 a.

c) Cochromatographie von ^{3}H-Seryl-tRNA (Fraktion I) und ^{14}C-Seryl-tRNA (Fraktion III), beide Fraktionen aus Abb. 10 d.

d) Cochromatographie von ^{3}H-Seryl-tRNA (Fraktion I) und ^{14}C-Seryl-tRNA (Fraktion III), die vor der Beladung mit Ammoniak entacetyliert wurde. Beide Fraktionen aus 10 d. (▲—▲) ^{3}H-Seryl-tRNA, (●—●) ^{14}C-Seryl-tRNA.

2.1.4. Anreicherung und Analyse von $tRNA_{3a}^{Ser}$

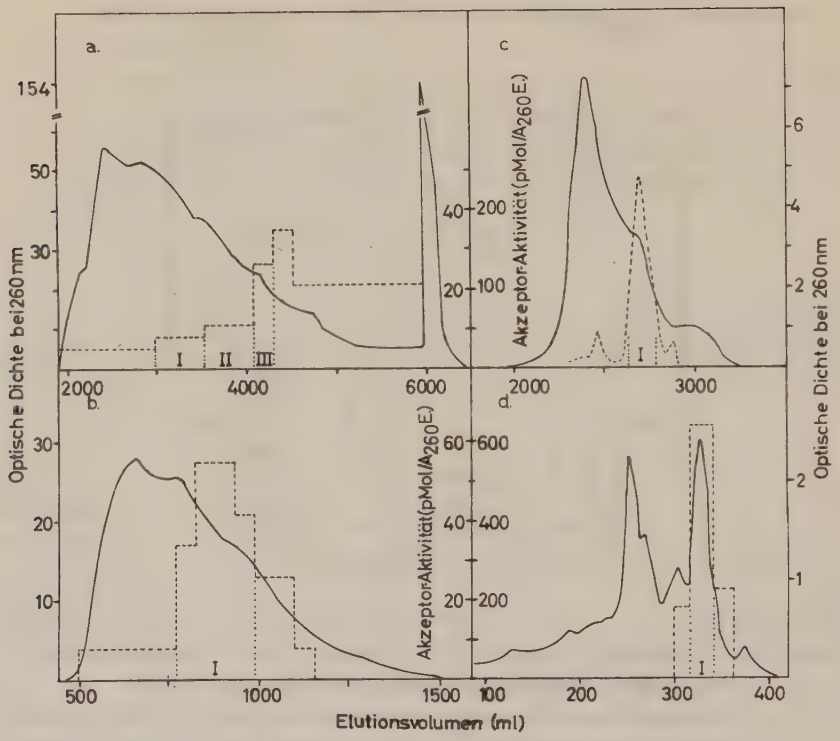

Abb. 12. Anreicherung von $tRNA_{3a}^{Ser}$.

a) 5.5 g fraktionierte tRNA (vgl. Text) wurden an einer BD-Cellulose-Säule (4.4 x 100 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.3 - 1.2 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, je 2 l. Dann wurde mit 1 l Endpuffer und abschliessend mit 2 l Endpuffer, der zusätzlich 20 % Äthanol enthielt, eluiert.

b) 13 000 A_{260}-Einheiten tRNA, die die $tRNA_{3a}^{Ser}$-Komponente enthielten, wurden an einer BD-Cellulose-Säule (2.4 x 50 cm) rechromatographiert. Die Elution erfolgte mit

einem linearen Gradienten: 0.3 - 1.0 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Cacodylatpuffer, pH 7.0, je 1 l.

c) Fraktion I aus 12 b (2 800 A_{260}-Einheiten tRNA) wurde in 300 ml Ausgangspuffer auf eine DEAE-Sephadex-A-50-Säule (2 x 150 cm) aufgezogen und chromatographiert (61). Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.4 - 0.54 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, je 2 l.

d) Fraktion I aus 12 c (180 A_{260}-Einheiten tRNA) wurde in 3 ml Ausgangspuffer gelöst und an einer BD-Cellulose-Säule (1 x 50 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.2 - 0.4 M NaCl, 7 M Harnstoff, pH 3.0, je 500 ml.
(——) Optische Dichte, (---) Serin-Akzeptoraktivität.

$tRNA^{Ser}_{3a}$-Fraktionen von Gegenstromverteilungen (z.B. Fraktion II und III, Abb. 6 a) und präparativen BD-Cellulose-Säulen, die zusätzlich $tRNA^{Ser}_{3b}$ und die $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten enthielten, wurden vereinigt und an einer BD-Cellulose-Säule fraktioniert (Abb. 12 a). Fraktion I dieser Säule enthielt 65 % $tRNA^{Ser}_{3a}$ und 30 % $tRNA^{Ser}_{3b}$, Fraktion II 15 % $tRNA^{Ser}_{3a}$ und 50 % $tRNA^{Ser}_{3b}$. Beide Fraktionen hatten eine geringe Serin-Akzeptoraktivität, deshalb wurden sie wieder vereinigt. In zwei Rechromatographien an BD-Cellulose-Säulen konnten von $tRNA^{Ser}_{3a}$ die Hauptkomponenten und $tRNA^{Ser}_{3b}$ vollständig abgetrennt werden. Abb. 12 b zeigt das Elutionsprofil von $tRNA^{Ser}_{3a}$ an einer BD-Cellulose-Säule, die mit einem Cacodylatpuffer eluiert wurde. Die weitere Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{3a}$ erfolgte durch Chromatographie an DEAE-Sephadex-A-50 (Abb. 12 c) und an BD-Cellulose (Abb. 12 d).
Die 3'-Endgruppe von $tRNA^{Ser}_{3a}$ wurde nach (67, 68) bestimmt. Aus Abb. 13 geht hervor, daß $tRNA^{Ser}_{3a}$ die gleiche 3'-Endgruppe G-C-C-A wie die $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten besitzt. Auf Grund der Endgruppenbestimmung konnte nicht ausgeschlossen werden, daß $tRNA^{Ser}_{3a}$ ein Umwandlungsprodukt der Hauptkomponenten ist. Durch eine T1-RNase-Spaltung von angereicherter $tRNA^{Ser}_{3a}$ sollte diese Frage entschieden werden.

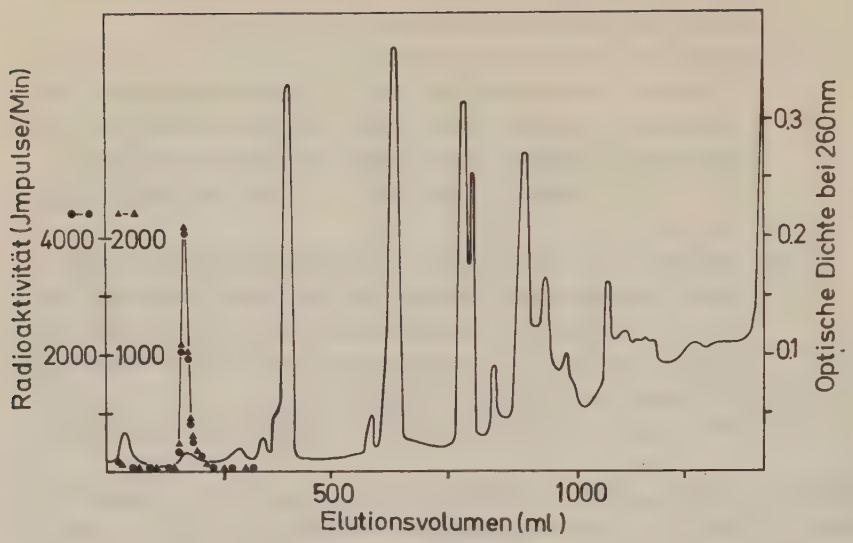

Abb. 13. Cochromatographie der Oligonucleotide nach T1-RNase-Spaltung von unfraktionierter ^{3}H-Seryl-tRNA^{Ser} (▲—▲) und ^{14}C-Seryl-tRNA$^{Ser}_{3a}$ (●—●). Versuchsbedingungen in 4.3.8. (——) Optische Dichte.

Das Oligonucleotidprofil (Abb. 14) sieht vollkommen anders aus als die entsprechenden Profile der tRNA^{Ser}-Hauptkomponenten (Abb. 5 und 8). Man erkennt sofort, daß tRNA$^{Ser}_{3a}$ kein Deka- und Undekanucleotid enthält. Das längste Oligonucleotid ist sehr wahrscheinlich ein Hepta- oder Oktanucleotid. Die Spaltprodukte wurden isoliert, mit Hochspannungselektrophorese gereinigt und durch ihre UV-Spektren charakterisiert. Die meisten Oligonucleotide besaßen andere Spektren als die T1-RNase-Spaltprodukte der tRNA^{Ser}-Hauptkomponenten, nur wenige konnten identifiziert werden. In Übereinstimmung mit Abb. 13 wurde das Trinucleotid C-C-A als Endgruppe gefunden. Das Dinucleotid C-m^2_2G>p, das in den meisten tRNA-Sequenzen aus Hefe enthalten ist, konnte nachgewiesen werden. Auch m^5C-G wurde identifiziert. C-C-G wurde im Bereich der Trinucleotide gefunden. Das Tetranucleotid T-ψ-C-G, das mit

wenigen Ausnahmen in allen bekannten tRNA-Sequenzen vorhanden ist, wurde isoliert. Die Elektropherogramme enthielten nur wenige, schwache Zusatzflecken, d.h. die gespaltene $tRNA^{Ser}_{3a}$-Fraktion hatte einen hohen Reinheitsgrad.

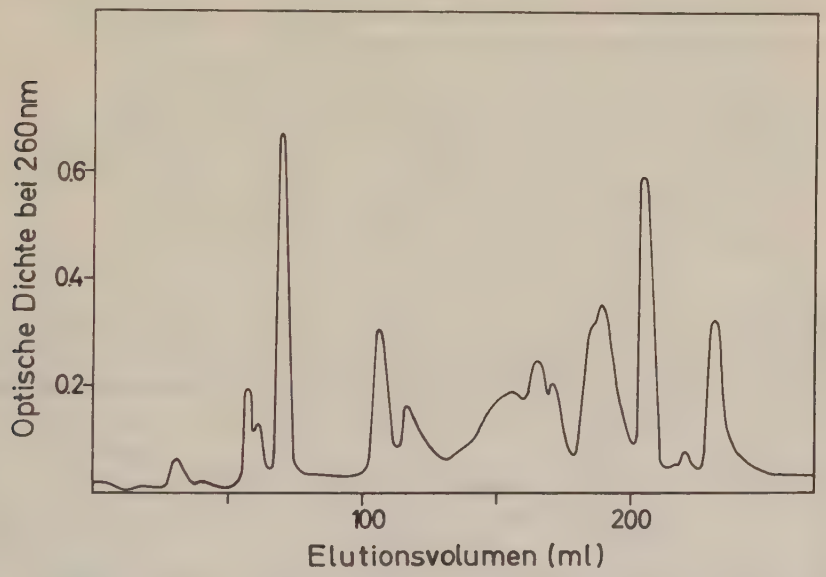

Abb. 14. Oligonucleotidprofil der T1-RNase-Spaltung von $tRNA^{Ser}_{3a}$. 20 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I, Abb. 12 d) wurden gespalten. Das Oligonucleotidgemisch wurde nach Zugabe von Harnstoff (ad 7 M) an einer DEAE-Cellulose-Säule (0.3 x 100 cm) chromatographiert.
(——) Optische Dichte.

2.1.5. Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{3b}$

Nachdem sich die Chromatographie an Ionenaustauschern bereits bei der Fraktionierung von $tRNA^{Ser}_{3a}$ bewährt hatte, wurde die Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{3b}$ analog durchgeführt. Die $tRNA^{Ser}_{3b}$-Fraktion, die als Ausgangsmaterial verwendet wurde, stammte aus den präparativen BD-Cellulose-Säulen der $tRNA^{Ser}_{3a}$-Fraktionierung, sie ent-

hielt deshalb $tRNA^{Ser}_{3a}$ und die $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten. Die Abtrennung der beiden "Verunreinigungen" gelang durch Rechromatographie an BD-Cellulose-Säulen. Schließlich erhielt man eine $tRNA^{Ser}_{3b}$-Fraktion mit einer Serin-Akzeptoraktivität von 50 - 60 pMol/A_{260}-Einheit (Fraktion I, Abb. 15 b). Die weitere Anreicherung erfolgte durch Chromatographie an DEAE-Sephadex-A-50 (Abb. 15 c) und an BD-Cellulose (Abb. 15 d).

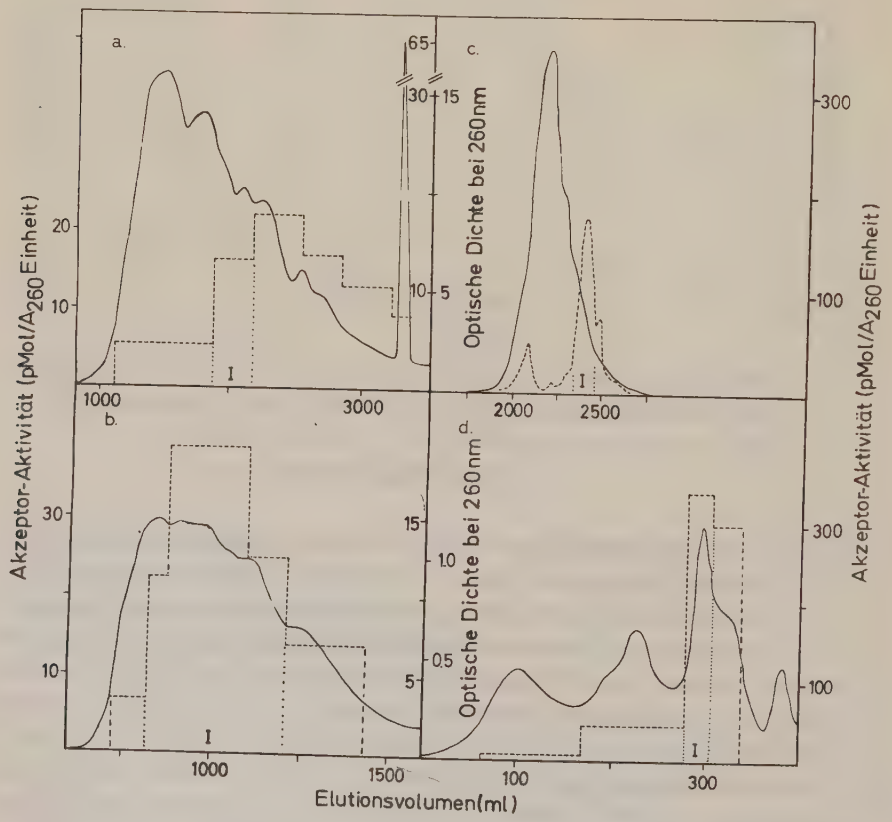

Abb. 15. Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{3b}$.
a) 37 000 A_{260}-Einheiten tRNA (vgl. Text) wurden an einer BD-Cellulose-Säule (2.4 x 80 cm) chromatographiert. Die

Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.5 - 1.0 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetatpuffer, pH. 5.0, je 1.5 l.

b) 8 000 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I aus 15 a) wurden an einer BD-Cellulose-Säule (2.4 x 50 cm) rechromatographiert. Gradient wie in Abb. 12 b.

c) 3 460 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I aus 15 b) wurden in 350 ml Ausgangspuffer auf eine DEAE-Sephadex-A-50-Säule (2 x 150 cm) aufgezogen. Gradient wie in Abb. 12 c.

d) 160 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I aus 15 c) wurden in 2 ml Ausgangspuffer auf eine BD-Cellulose-Säule (1 x 50 cm) aufgezogen. Gradient wie in Abb. 12 c.
(——) Optische Dichte, (---) Serin-Akzeptoraktivität.

Die $tRNA^{Ser}_{3b}$-Fraktion I, Abb. 15 d, war nicht so hoch angereichert wie die entsprechende $tRNA^{Ser}_{3a}$-Fraktion (Abb. 12 d). Die geringe Serin-Akzeptoraktivität konnte auf die Anwesenheit von Aggregaten zurückgeführt werden, die bei der Gelelektrophorese (64) beobachtet wurden.

2.2. Multiplizität der Serin tRNAs aus Bäckerhefe

Im unfraktionierten tRNA-Gemisch der Bäckerhefe wurden zwei $tRNA^{Ser}$-Komponenten gefunden (Abb. 16). Die Hauptkomponente hatte die gleiche Sequenz (53) wie $tRNA^{Ser}_2$ aus Brauerhefe. Die Nebenkomponente zeigte im Ribosomenbindungstest (vgl. 2.6.) und bei der Cochromatographie an analytischen BD-Cellulose-Säulen die gleichen Eigenschaften wie $tRNA^{Ser}_{3a}$ aus Brauerhefe.

2.2.1. Anreicherung und Analyse von $tRNA^{Ser}_2$

Unfraktionierte tRNA aus Bäckerhefe wurde an einer BD-Cellulose-Säule chromatographiert (Abb. 17 a), dadurch gelang es, $tRNA^{Ser}_2$ (Fraktion III, Abb. 17 a) von $tRNA^{Tyr}$ (Fraktion IV) und $tRNA^{Phe}$ (Fraktion V) abzutrennen. Die frühzeitige Abtrennung von $tRNA^{Tyr}$ und $tRNA^{Phe}$ bringt Vorteile, da beide tRNAs in Gegenstromverteilungen im Isopropanol-Phosphat-System und Ammoniumsulfat-System

ähnliche Verteilungskoeffizienten wie $tRNA_2^{Ser}$ besitzen (57). Die weitere Anreicherung erfolgte mit Gegenstromverteilungen nach (69).

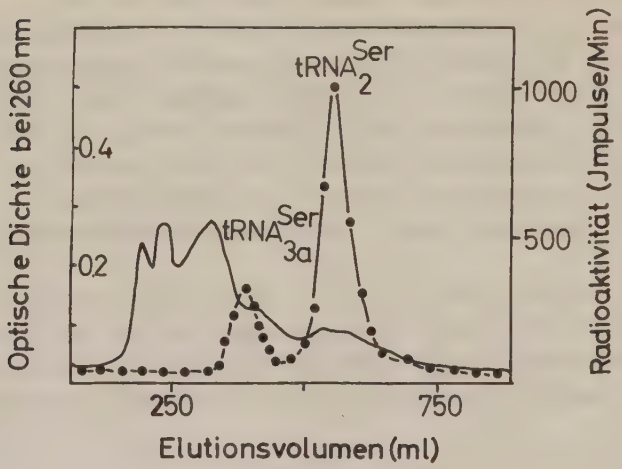

Abb. 16. Elutionsprofil einer BD-Cellulose-Säule von unfraktionierter, mit ^{14}C-Serin beladener tRNA aus Bäckerhefe. (——) Optische Dichte, (●——●) Radioaktivität.

Das $tRNA^{Ser}$-Profil der Gegenstromverteilung im Butylamin-System ist in Abb. 17 b dargestellt. Die angereicherte $tRNA_2^{Ser}$-Fraktion VI, Abb. 17 b, enthielt Aggregate, zum großen Teil "Dimere", wie an standardisierten Sephadex-G-100-Säulen (65) nachgewiesen wurde. Nach Zerstören der Aggregate (65) wurde die $tRNA_2^{Ser}$-Komponente mit einer Gegenstromverteilung im Isopropanol-Phosphat-System weiter angereichert (Abb. 17 c). 100 mg $tRNA_2^{Ser}$ wurden aus 15 g unfraktionierter tRNA isoliert, das entspricht etwa 21 % der eingesetzten $tRNA^{Ser}$-Menge. Die Akzeptoraktivität betrug ungefähr 1 300 pMol/A_{260}-Einheit, d.h. $tRNA_2^{Ser}$ war 25 - 30fach gegenüber der Start-tRNA angereichert. Die Bilanz der Fraktionierung ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

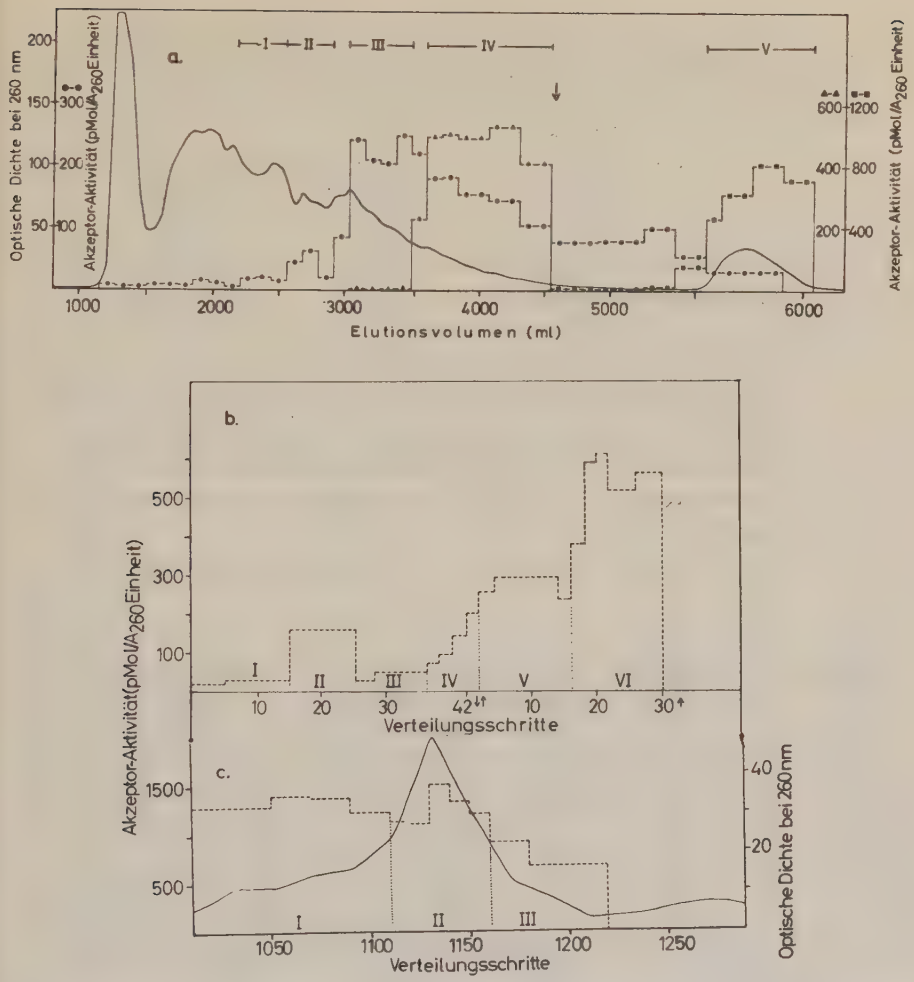

Abb. 17. Anreicherung von $tRNA_2^{Ser}$.

a) 15 g unfraktionierte tRNA aus Bäckerhefe, gelöst in 200 ml 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, wurden auf eine BD-Cellulose-Säule (4.4 x 100 cm) aufgezogen. Die Elution erfolgte zuerst mit einem linearen Salzgradienten: 0.3 - 1.5 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, je 2 l; dann mit 500 ml

Endpuffer und zum Schluß mit einem linearen Äthanol-gradienten: Endpuffer - Endpuffer, der 20 % Äthanol enthielt, je 1 l. Akzeptoraktivität für Ser (●——●), Tyr (▲——▲) und Phe (■——■).

b) Fraktion III aus 17 a (36 960 A_{260}-Einheiten tRNA) wurde mit einer Gegenstromverteilung im Butylamin-System (23 Anteile Bu_2O auf 100 Teile BuOH) weiter angereichert. Nach 42 Verteilungsschritten wurden 30 Oberphasen (↑) zusätzlich entnommen.

c) Fraktion VI aus 17 b (5 740 A_{260}-Einheiten tRNA) wurden desaggregiert (65) und mit einer Gegenstromverteilung im Isopropanol-Phosphat-System fraktioniert. Die erste Entnahme der automatischen Apparatur erfolgte nach 630 Verteilungsschritten. Die Verteilung wurde nach 1 310 Verteilungsschritten beendet. Die tRNA wurde durch Flotation isoliert (13).

(——) Optische Dichte, (---) Serin-Akzeptoraktivität.

Fraktion	tRNA-Menge A_{260}-Einh.	Akzeptoraktivität pMol/A_{260}-Einheit			tRNA-Menge µMol		
		Ser	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Phe
Start	300 000	45	39	38	13.5	11.7	11.4
I - IV	108 840	93-238			12.0		
III	36 960	238			8.8		
IV	7 586		500			3.8	
V	6 231			800			5.0

Tabelle 4 a. Bilanz der Chromatographie an BD-Cellulose (Abb. 17 a).

Fraktion	tRNA-Menge A_{260}-Einh.	Akzeptoraktivität pMol/A_{260}-Einheit	$tRNA^{Ser}$ µMol
Start, Abb. 17 b	36 960	238	8.8
V, Abb. 17 b	3 700	239	0.9
VI, Abb. 17 b	6 300	513	3.2
Start, Abb. 17 c	5 740	559	3.2
I, Abb. 17 c	902	1 390	1.3
II, Abb. 17 c	1 140	1 270	1.5

Tabelle 4 b. Bilanz der Gegenstromverteilungen.

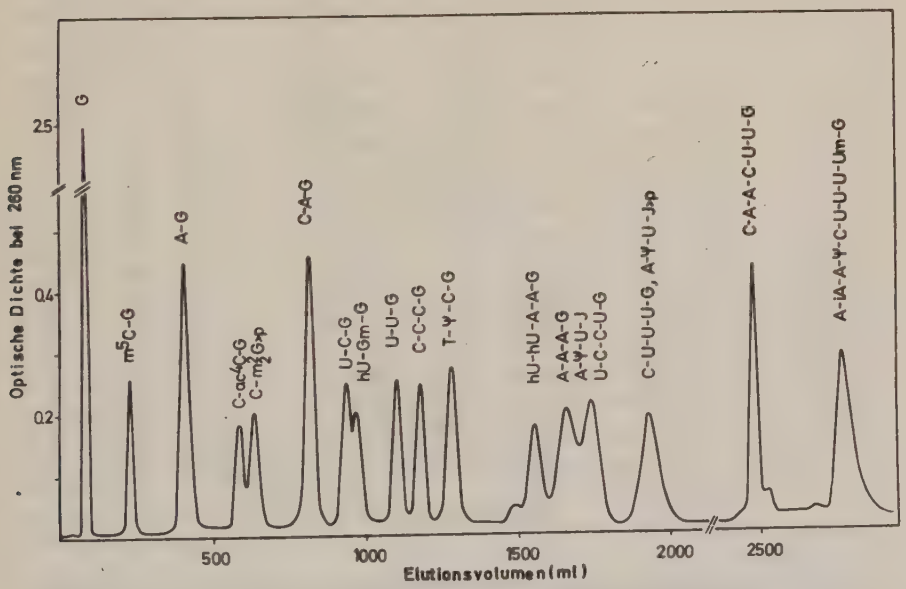

Abb. 18. Oligonucleotidprofil der T1-RNase/PME-Spaltung von $tRNA_2^{Ser}$. 224 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion II, Abb. 17 c) wurden gespalten und an einer DEAE-Cellulose-Säule (1 x 50 cm), die mit einem Ammoniumcarbonat-Gradienten eluiert wurde, chromatographiert.
(——) Optische Dichte.

Die Reinheit und Zusammensetzung der angereicherten $tRNA_2^{Ser}$-Fraktion II, Abb. 17 c, wurde durch zwei Analysen überprüft. Unter den Oligonucleotiden (Abb. 18, Tabelle 5) wurden 1 Mol T-Ψ-C-G, 0.7 Mol U-C-C-U-G und 0.8 Mol C-U-U-U-G pro Mol tRNA nachgewiesen. Das Pentanucleotid C-U-C-U-G aus $tRNA_1^{Ser}$ wurde nicht gefunden. Die gespaltene tRNA enthielt 1 Mol C-ac^{4}C-G. Eine geringe Verunreinigung der $tRNA_2^{Ser}$-Fraktion durch $tRNA_1^{Ser}$ konnte auf Grund dieser Analyse nicht ausgeschlossen werden, da die verwendete DEAE-Cellulose-Säule eventuell vorhandenes Undekanucleotid nicht vom Dekanucleotid abtrennt. Diese Frage wurde durch die zweite Analyse geklärt (Abb. 19).

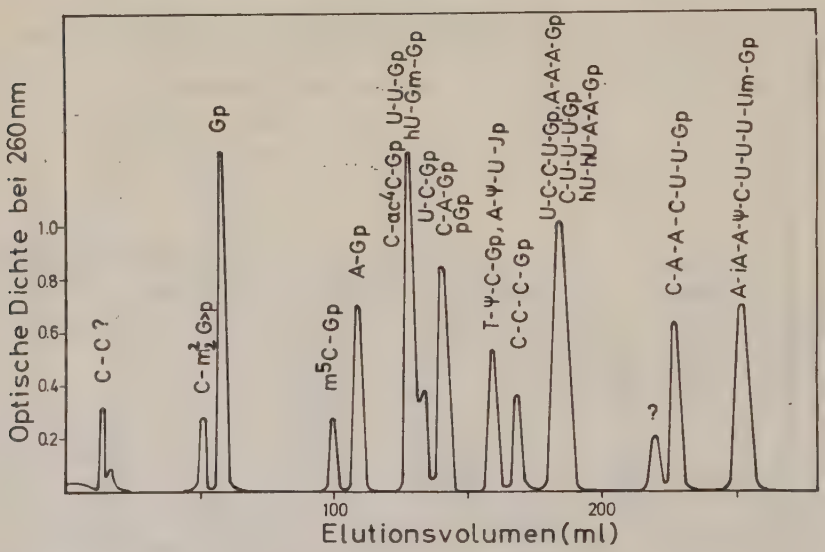

Abb. 19. Oligonucleotidprofil der T1-RNase-Spaltung von $tRNA_2^{Ser}$. 26 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion II, Abb. 17 c) wurden gespalten und nach Zugabe von Harnstoff (ad 7 M) wurden die Oligonucleotide an einer DEAE-Cellulose-Säule (0.3 x 100 cm) getrennt. (——) Optische Dichte.

Hinter dem Dekanucleotid trat im Oligonucleotidprofil kein weiterer Absorptionsgipfel auf, d.h. die $tRNA_2^{Ser}$-Fraktion war nicht

durch $tRNA_1^{Ser}$ verunreinigt. Beide Oligonucleotidanalysen bestätigen das Ergebnis von Neelon et al. (54), daß in der Bäckerhefe nur eine $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponente enthalten ist. Im Gegensatz zu (54) war die hier analysierte $tRNA_2^{Ser}$-Spezies vollständig acetyliert.

Oligonucleotid	R_{Up} (pH 2.7)	nMol	Mol/Mol tRNA
G	0.00		8.3
m^5C-G	0.10	193	1.2
A-G	0.12	398	2.5
C-C-G	0.06	144	1.0
C-ac^4C-G	0.42		
C-m_2^2G>p	0.49	112	0.7
C-A-G	0.19	305	1.9
U-C-G	0.49	137	0.9
hU-Gm-G	0.67	158	1.0
U-U-G	0.80	159	1.0
C-C-C-G	0.09	151	1.0
T-ψ-C-G	0.72	150	1.0
hU-hU-A-A-G	0.68	124	0.8
A-A-A-G	0.18	174	1.1
U-C-C-U-G	0.64	109	0.7
A-ψ-U-I	0.88	60	0.4
C-U-U-U-G	0.92	130	0.8
A-ψ-U-I>p	1.18	49	0.3
C-A-A-C-U-U-G	0.72	128	0.8

Tabelle 5. Analyse der T1-RNase/PME-Oligonucleotide von $tRNA_2^{Ser}$

2.2.2. Anreicherung von $tRNA_{3a}^{Ser}$

2.2.2.1. Versuche zur Derivatisierung von Seryl-tRNA

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche wurden in Zusammenarbeit mit H. von Heyden durchgeführt.

Maxwell et al. (70) haben beobachtet, daß das Elutionsverhalten von tRNAs an BD-Cellulose-Säulen durch exponierte aromatische Gruppen beeinflußt wird. $tRNA^{Tyr}$(Hefe) und $tRNA^{Try}$(Hefe) werden normalerweise im Salzgradienten eluiert, nach ihrer Aminoacylierung werden sie jedoch erst durch den Äthanolgradienten von der BD-Cellulose-Säule heruntergewaschen (70). Eine Verschiebung in umgekehrter Richtung wurde für $tRNA^{Phe}$(Hefe) gefunden, die unbeladen im Äthanolgradienten eluiert wird (59), spaltet man die Y-Base (71) ab, kann man $tRNA^{Phe}$(HCl) bereits im Salzeluat nachweisen (72). Substituiert man die Aminogruppe der übrigen Aminoacyl-tRNAs entweder mit einem Phenoxyacetyl-Rest (73) oder Carbobenzoxy-Rest (74), so kann man die derivatisierte tRNA, da sie erst mit dem Äthanolgradienten eluiert wird, ebenfalls von den unbeladenen und nicht derivatisierten tRNA-Molekülen durch Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen abtrennen.

Mit dieser Technik sollte die Anreicherung der $tRNA^{Ser}_{3a}$-Komponente schneller durchführbar sein. Vorversuche wurden ausgeführt, um festzustellen, ob sich diese Methoden für die Anreicherung der $tRNA^{Ser}$-Spezies eignen. Für diese Experimente wurde eine $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Fraktion (360 pMol/A_{260}-Einheit) ausgewählt. Optimale Bedingungen, die zu einer vollständigen Beladung dieser Fraktion führten, sind in 4.3.6. beschrieben. Die Derivatisierungen wurden nach (73) und (74) durchgeführt. Aus der derivatisierten Seryl-tRNA wurden in beiden Aufarbeitungen nur 5 % der eingesetzten $tRNA^{Ser}$-Menge zurückgewonnen (Abb. 20). Dieses schlechte Ergebnis veranlaßte uns, nach Gründen für die geringe Ausbeute zu suchen. Die Vermutung, daß ein Teil der derivatisierten Seryl-tRNA bereits im Salzgradienten der BD-Cellulose-Säule eluiert wird, konnte durch die Cochromatographie von derivatisierter ^{14}C-Seryl-tRNA und ^{3}H-Seryl-tRNA ausgeschlossen werden. In mehreren Versuchen wurde das Ausmaß der Hydrolyse vom Zeitpunkt der präparativen Beladung bis zur Derivatisierung bestimmt. Es zeigte sich, daß während der Reinigungsschritte (Phenolextraktion, Äthanolfällung, Dialyse vgl. 4.3.6.) 40 - 50 % der Seryl-tRNA hydrolysiert wurde. Die Untersuchung der Derivatisierungsreaktion ergab, daß die Geschwindigkeit der Um-

setzung zu klein war, um unter den angewandten Bedingungen (10 Min., pH 8.0 in (73) und 30 Min., pH 7.0 in (74)) die eingesetzte Seryl-tRNA vollständig zu derivatisieren. Im Verlauf der Derivatisierung wurde nochmals etwa 10 % der Seryl-tRNA (präparative Beladung 100 %) durch Hydrolyse zerstört.

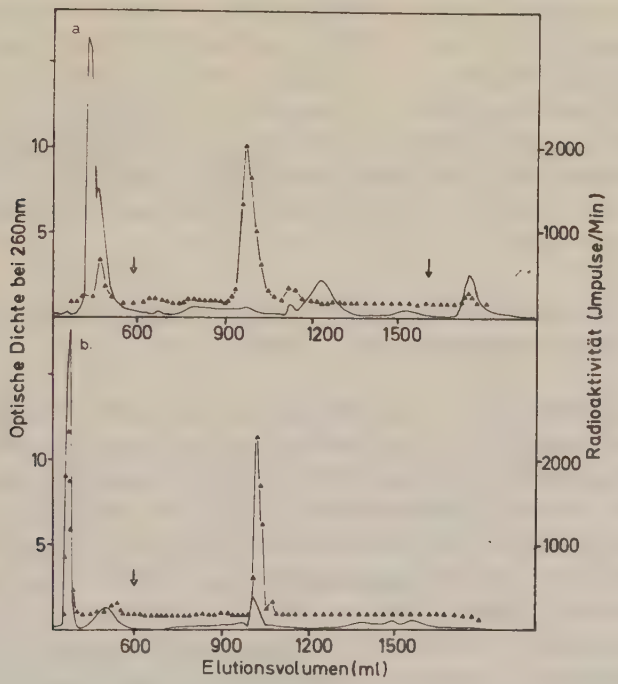

Abb. 20. Trennung von derivatisierter und nicht derivatisierter Seryl-tRNA an BD-Cellulose-Säulen.

a) Eine angereicherte $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$-Fraktion (1 500 A_{260}-Einheiten)wurde mit Serin beladen und derivatisiert (73).

b) Eine angereicherte $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$-Fraktion (970 A_{260}-Einheiten)wurde mit Serin beladen und derivatisiert (74).

Gradient (vgl. 4.3.6). In 20 a wurde zum Schluß (2. Pfeil) mit Endpuffer, der 20 % Äthanol enthielt, eluiert.
(——) Optische Dichte, (▲——▲) ^{3}H-Seryl-tRNA.

Es wurde versucht, die Ausbeute an derivatisierter Seryl-tRNA durch Erhöhung des pH-Wertes und durch Verlängerung der Reaktionsdauer zu steigern. Experimente bei höheren pH-Werten führten leider zu einer verstärkten Hydrolyse der Esterbindung. Die Verdoppelung der Reaktionszeit ergab schließlich eine Zunahme an derivatisierter Seryl-tRNA, denn nach Abspaltung der substituierten Aminosäure und Reinigung der tRNA wurden bei der Derivatisierung nach (73) 20 % und nach (74) 11 % der in die präparative Beladung eingesetzten $tRNA^{Ser}$-Menge isoliert. Durch beide Methoden wurde die ausgewählte $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Fraktion nur um den Faktor 2 angereichert. Auf Grund der geringen Ausbeute und schlechten Anreicherung erschien die Reinigung von $tRNA^{Ser}_{3a}$ mit Hilfe der Derivatisierung wenig erfolgversprechend.

2.2.2.2. Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{3a}$ durch Chromatographie an Ionenaustauschern

$tRNA^{Ser}_{3a}$ aus Bäckerhefe wurde ähnlich wie die $tRNA^{Ser}_{3}$-Komponenten aus Brauerhefe durch Kombination von verschiedenen Chromatographiemethoden gereinigt (Abb. 21), nachdem die Versuche zur Derivatisierung fehlgeschlagen waren. Die $tRNA^{Ser}_{3a}$-Fraktion, die zur Anreicherung ausgewählt wurde, besaß eine Serin-Akzeptoraktivität von 15 $pMol/A_{260}$-Einheit. Die $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung dieser Fraktion geht aus Abb. 21 a hervor. Die Hauptkomponente $tRNA^{Ser}_{2}$ wurde durch Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen abgetrennt. Fraktion I, Abb. 21 b, enthält nur die $tRNA^{Ser}_{3a}$-Komponente. Die weitere Anreicherung erfolgte an einer RPC-3-Säule (Abb. 21 c) und an einer DEAE-Sephadex-A-50-Säule (Abb. 21 d). Die Serin-Akzeptoraktivität der angereicherten $tRNA^{Ser}_{3a}$-Fraktion betrug 450 - 500 $pMol/A_{260}$-Einheit, das entspricht einer 30fachen Anreicherung der Start-tRNA.

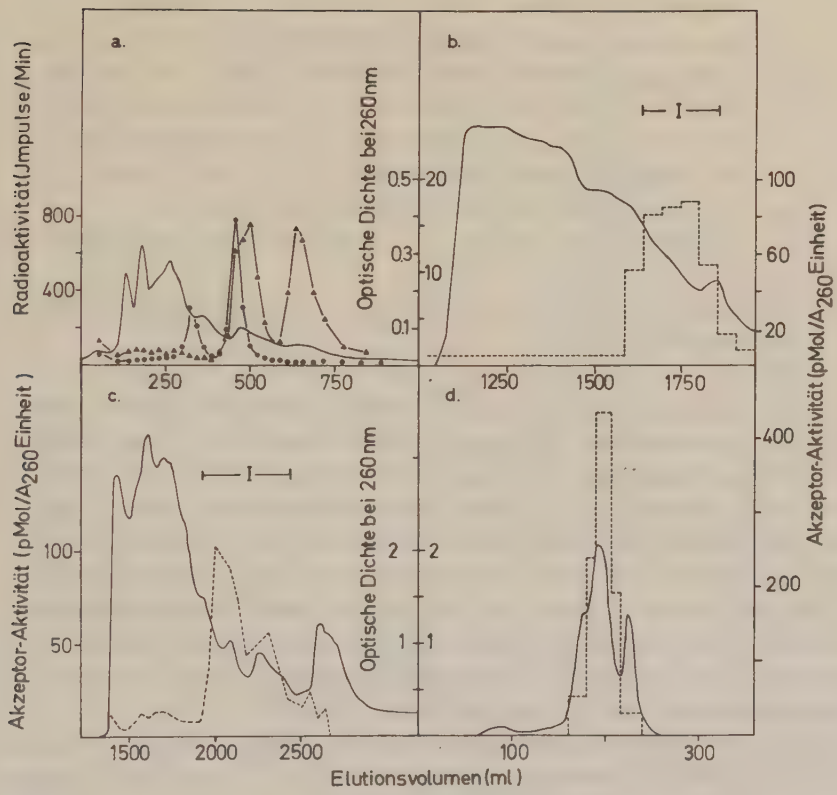

Abb. 21. Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{3a}$.

a) Cochromatographie von ^{14}C-Seryl-tRNA (Bäckerhefe) (●——●) und ^{3}H-Seryl-tRNA (Brauerhefe) (▲—▲) an einer analytischen BD-Cellulose-Säule.

b) 16 330 A_{260}-Einheiten tRNA, die $tRNA^{Ser}_{3a}$ enthielten, wurden an einer BD-Cellulose-Säule (2.4 x 50 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.3 - 0.8 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, je 1 l.

c) 2 000 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I aus 21 b) wurden an einer RPC-3-Säule (1.4 x 240 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur mit einem li-

nearen Gradienten: 0.3 - 0.7 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 4.5, je 1.5 l.

d) 240 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I aus 21 c) wurden in 60 ml Ausgangspuffer auf eine DEAE-Sephadex-A-50-Säule (1 x 150 cm) aufgezogen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.4 - 0.54 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, je 1 l.
(——) Optische Dichte, (---) Serin-Akzeptoraktivität.

2.3. Bestimmung des N^4-Acetylcytidingehaltes und Entacetylierung von Serin tRNA

Bei den Anreicherungen der $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten wurde mehrmals auf Unterschiede im Acetylgehalt hingewiesen. Eine quantitative Bestimmung der N^4-Acetylcytidin-Menge könnte auf verschiedene Weise erfolgen, z.B. durch Fluoreszenzmessung, durch UV-Messung oder durch enzymatische Bestimmung des Acetylrestes (75). Von diesen drei Möglichkeiten erwies sich die UV-Messung als einfachste Methode; denn das UV-Spektrum des N^4-Acetylcytidins unterscheidet sich signifikant von den Spektren der übrigen Nucleotide, die in $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$ vorkommen, weil es ein langwelliges Extinktionsmaximum besitzt (75).
Die Extinktionskoeffizienten von ac^4C wurden bei 310 nm ermittelt: in 1 N Salzsäure beträgt ε_{310} = 1 700 M^{-1} cm^{-1}, d.h. 1 A_{310}-Einheit entspricht 59 nMol N^4-Acetylcytidin und in 0.1 N Natronlauge beträgt ε_{310} = 1 100 M^{-1} cm^{-1}, d.h. 1 A_{310}-Einheit entspricht 91 nMol N^4-Acetylcytidin. Spaltet man durch alkalische Hydrolyse den Acetylrest von ac^4C ab, so entsteht Cytidin, das bei 310 nm nicht mehr absorbiert. Aus der Absorptionsdifferenz bei 310 nm kann man mit Hilfe der entsprechenden Extinktionskoeffizienten den Acetylgehalt der $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten berechnen (vgl. Tabelle 6).
Die Halbwertszeit der Acetylabspaltung beträgt für $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ in 0.05 N Natronlauge 6 Min. und in 7 M Ammoniak 3 Min., für ac^4C wurde entsprechend 2 Min. 30 Sek. und 1 Min. 15 Sek. ermittelt (vgl. Abb. 22).

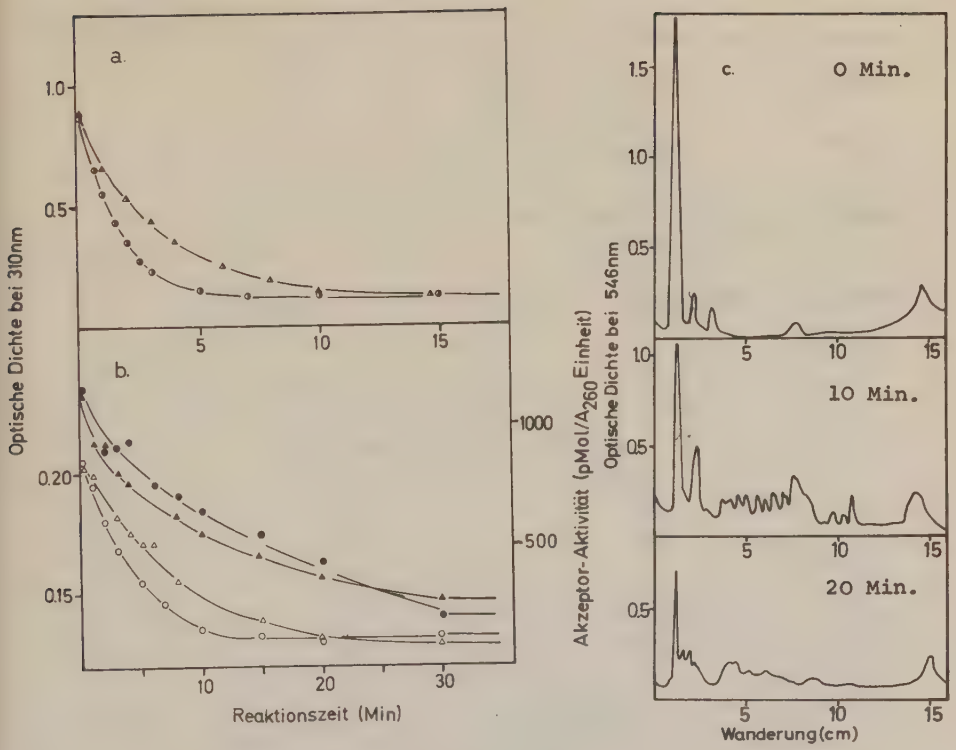

Abb. 22. Kinetik der Entacetylierung von ac^{4}Cp und tRNA$^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$.

a) 3.95 A_{260}-Einheiten ac^{4}Cp wurden bei 37 °C mit 7 M Ammoniak (o——o) und mit 0.05 N Natronlauge (Δ——Δ) inkubiert. Die Extinktionsabnahme wurde bei 310 nm in 1 N Salzsäure gemessen (vgl. 4.3.7.).

b) 5.1 A_{260}-Einheiten tRNA$^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ wurden bei 37 °C mit 7 M Ammoniak (o——o) und 0.05 N Natronlauge (Δ——Δ) inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, deren optische Dichte bei 310 nm (o, Δ) und deren Serin-Akzeptoraktivität (●, ▲) bestimmt wurde.

c) Densitogramme von tRNA$^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ nach 0, 10 und 20 Min. Ammoniakinkubation.

tRNA	Fraktion	Acetylgehalt (%) HCl	Acetylgehalt (%) NaOH	Acetylgehalt (%) nach T1-RNase-Spaltg.
$tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$	I, Abb. 3 b	0	0	0
$tRNA^{Ser}_{2}$	II, Abb. 17 c	103	91	100
$tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$	I, Abb. 7 b	61	57	60 - 65

Tabelle 6. Acetylgehalt von Serin tRNAs (vgl. 4.3.7.).

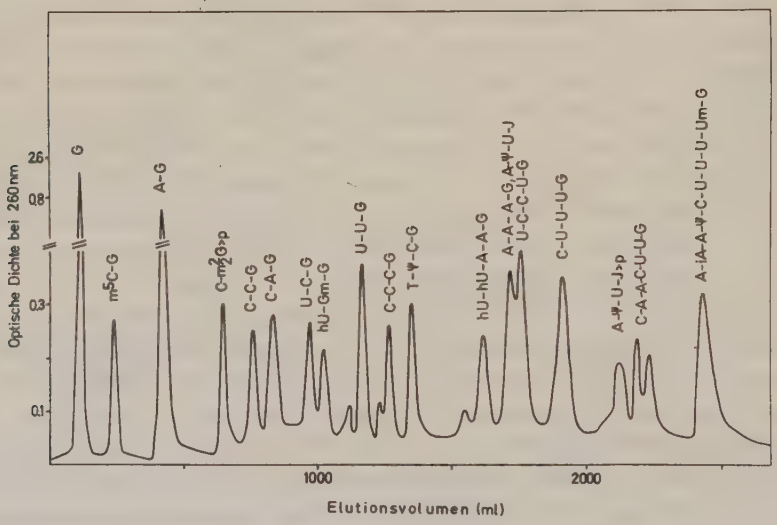

Abb. 23. Oligonucleotidprofil der T1-RNase/PME-Spaltung von $tRNA^{Ser}_{2(-ac)}$.
200 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Ser}_{2(-ac)}$, die durch Ammoniakinkubation aus $tRNA^{Ser}_{2}$ (Bäckerhefe) hergestellt worden waren (vgl. 4.3.7.), wurden gespalten und an einer DEAE-Cellulose-Säule, die mit einem Ammoniumcarbonat-Gradienten eluiert wurde, getrennt. (——) Optische Dichte.

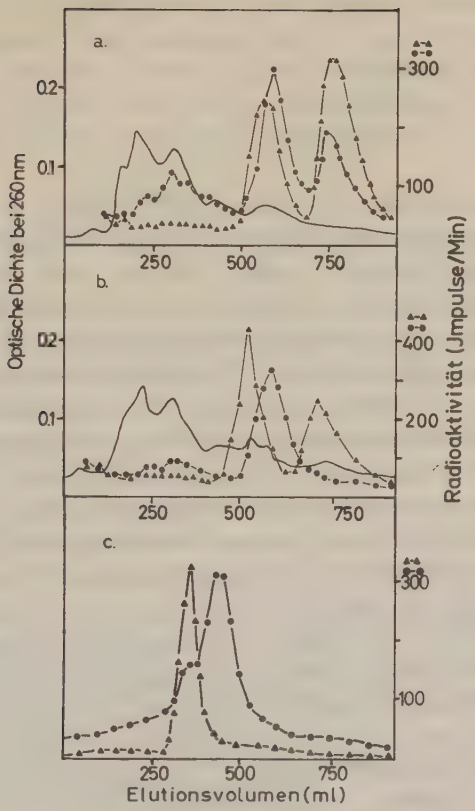

Abb. 24. Chromatographie von acetylierten und entacetylierten $tRNA^{Ser}$-Fraktionen an BD-Cellulose-Säulen.

a) Cochromatographie von entacetylierter ^{14}C-Seryl-$tRNA^{Ser}_{1,2,2(-c)}$, die vor der Entacetylierung nur einen tRNA-Gipfel zeigte, und den Referenzsubstanzen ^{3}H-Seryl-$tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ und ^{3}H-Seryl-$tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$. Alle $tRNA^{Ser}$-Fraktionen waren aus Brauerhefe.

b) Cochromatographie von entacetylierter ^{14}C-Seryl-$tRNA^{Ser}_{2}$ (Bäckerhefe) und den Referenzsubstanzen ^{3}H-Seryl-$tRNA^{Ser}_{2}$ (Bäckerhefe) und ^{3}H-Seryl-$tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ (Brauerhefe).

c) Cochromatographie von ^{3}H-Seryl-tRNA$^{Ser}_{3a}$ und ^{14}C-Seryl-tRNA$^{Ser}_{3a}$, die vor der Beladung mit 7 M Ammoniak inkubiert worden war.
(——) Optische Dichte, (●—●) ^{14}C-Seryl-tRNA, (▲—▲) ^{3}H-Seryl-tRNA.

Die Serin-Akzeptoraktivität von tRNA$^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ nahm parallel mit der Hydrolyse der Acetylgruppe ab. Dieser Befund beruhte nicht auf dem Verlust der Acetylgruppe, sondern ließ sich auf die gleichzeitig verlaufende hydrolytische Spaltung der tRNA zurückführen, wie Abb. 22 c zeigt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Min. in 7 M Ammoniak bei 37 ^{o} war die Acetylgruppe von tRNA$^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ vollständig abgespalten. Unter diesen Bedingungen wurden alle weiteren präparativen Entacetylierungen durchgeführt (vgl. 4.3.7.). In Abb. 23 ist das Oligonucleotidmuster von tRNA$^{Ser}_{2}$ nach Ammoniakinkubation dargestellt. Ein Vergleich der Abb. 23 und Abb. 18 zeigt, daß im Oligonucleotidprofil der mit Ammoniak behandelten tRNA$^{Ser}_{2}$ das Trinucleotid C-ac^{4}C-G vollständig fehlt, statt dessen findet man quantitativ das Umwandlungsprodukt C-C-G, d.h. aus tRNA$^{Ser}_{2}$ ist tRNA$^{Ser}_{2(-ac)}$ entstanden. Die kleinen zusätzlichen Oligonucleotidgipfel der Abb. 23 dürften aus den Hydrolyse-Bruchstücken der tRNA$^{Ser}_{2}$ stammen.
Nach Abspaltung der Acetylgruppe kann man den Anteil an tRNA$^{Ser}_{1}$ im Dreikomponentengemisch tRNA$^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ bestimmen, denn tRNA$^{Ser}_{1(-ac)}$ läßt sich von tRNA$^{Ser}_{2(-ac)}$ durch Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen abtrennen (Abb. 24 a). Bei der quantitativen Auswertung der Elutionsprofile wird vorausgesetzt, daß die Hydrolyse und Entacetylierung aller tRNA^{Ser}-Komponenten gleich verläuft. Durch Planimetrieren der beiden tRNA^{Ser}-Gipfel der entacetylierten Seryl-tRNA$^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ (Abb. 24 a) konnte gezeigt werden, daß in dem Gemisch noch etwa 30 % tRNA$^{Ser}_{1}$ enthalten sind. Die gleiche Menge an tRNA$^{Ser}_{1}$ wurde auch nach T1-RNase-Spaltungen in dieser tRNA^{Ser}-Fraktion gefunden (vgl. Abb. 8). tRNA$^{Ser}_{2(-ac)}$ läßt sich von tRNA$^{Ser}_{2}$ durch Chromatographie an BD-Cellulose unterscheiden (Abb. 24 b). Das Elutionsverhalten von Seryl-tRNA$^{Ser}_{3a}$ an BD-Cellulose verändert sich ebenfalls nach der Ammoniakinkubation (Abb. 24 c).

2.4. Verhalten der Serin tRNAs in den angewandten Trennmethoden

2.4.1. Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen

Analytische BD-Cellulose-Säulen (vgl. 4.3.2.) dienten nach allen Anreicherungsschritten zur Charakterisierung der $tRNA^{Ser}$-Fraktionen.
In Abb. 25 sind die Elutionsprofile der angereicherten $tRNA^{Ser}$-Nebenkomponenten aus Brauerhefe dargestellt. Der $tRNA^{Ser}_{3a}$-Gipfel läßt sich durch Ammoniakinkubation an die Stelle des $tRNA^{Ser}_{3b}$-Gipfels verschieben (Abb. 24 c).
Die Cochromatographie von Seryl-tRNA aus Bäckerhefe und den beladenen $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten aus Brauerhefe zeigt, daß die $tRNA^{Ser}_2$-Spezies etwas früher eluiert wird als die $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Fraktion (Abb. 21 a). Bei der Chromatographie von dem $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Gemisch an präparativen BD-Cellulose-Säulen wurde $tRNA^{Ser}_2$ ebenfalls bevorzugt in den ersten Fraktionen des $tRNA^{Ser}$-Hauptgipfels eluiert. Mit Hile dieser Fraktionen sollte es möglich sein, die $tRNA^{Ser}_2$-Komponente von der $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Hauptmenge abzutrennen und anzureichern.
$tRNA^{Ser}_{2(-ac)}$ wurde von der analytischen BD-Cellulose-Säule etwas später eluiert als $tRNA^{Ser}_2$ (Abb. 24 b).
$tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ läßt sich von dem Dreikomponentengemisch $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ leicht abtrennen (Abb. 2).
Bei der Chromatographie an BD-Cellulose in Natriumacetatpuffer (59) konnte ein Teil der Serin tRNA erst durch ein Gemisch aus Endpuffer und 20 % Äthanol eluiert werden. Die Zusammensetzung dieser $tRNA^{Ser}$-Fraktion variierte sehr stark. Sie bestand teilweise aus $tRNA^{Ser}$-Aggregaten (vgl. 2.4.4.). Da diesem $tRNA^{Ser}$-Gipfel keine bestimmte $tRNA^{Ser}$-Komponente zugeordnet werden konnte, wurde er nicht in die Elutionsprofile der analytischen BD-Cellulose-Säulen eingezeichnet.

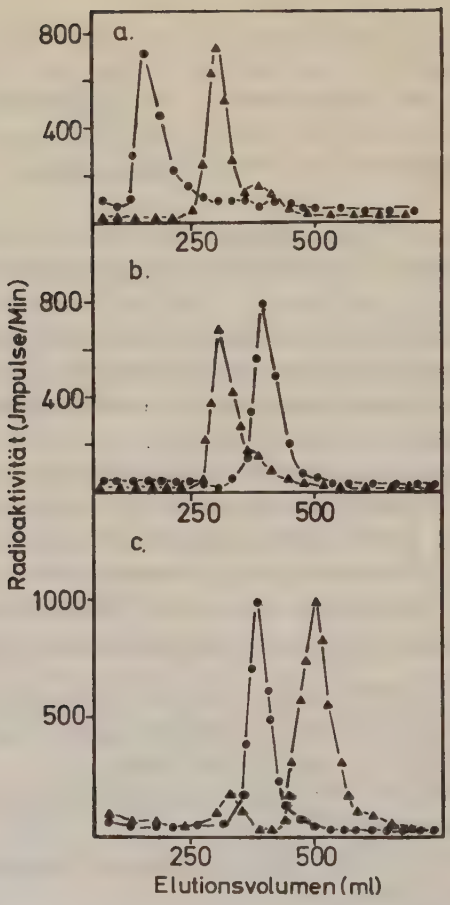

Abb. 25. Chromatographie der $tRNA^{Ser}$-Nebenkomponenten aus Brauerhefe an BD-Cellulose-Säulen.

a) Cochromatographie von ^{3}H-Seryl-$tRNA^{Ser}_{3a}$ und ^{14}C-Seryl-$tRNA^{Ser}_{x}$ (Fraktion I, Abb. 10 c).

b) Cochromatographie von ^{3}H-Seryl-$tRNA^{Ser}_{3a}$ und ^{14}C-Seryl-$tRNA^{Ser}_{3b}$.

c) Cochromatographie von ^{14}C-Seryl-$tRNA^{Ser}_{3b}$ und unfraktionierter ^{3}H-Seryl-tRNA aus Bäckerhefe.
(●——●) ^{14}C-Seryl-tRNA, (▲——▲) ^{3}H-Seryl-tRNA.

2.4.2. Gegenstromverteilungen im Tri-n-butylamin-System

Die relative $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung von Fraktionen zweier Gegenstromverteilungen wurde durch Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen bestimmt (Tabelle 7 und 8).

Fraktion	$tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$	$tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$	$tRNA^{Ser}_{3a}$	$tRNA^{Ser}_{3b}$	$tRNA^{Ser}_{x}$
Start	6	72	16	6	
I	-	12	63	25	
II	3	38	41[a]		18
III	2	54	23	-	21
IV	4	94	2	-	-
V	4	96	-	-	-
VI	5	95	-	-	-
VII	5	95	-	-	-
VIII	17	83	-	-	-

Tabelle 7. Relative prozentuale Zusammensetzung der $tRNA^{Ser}$-Fraktionen aus Abb. 6 a.
Die Werte wurden durch Planimetrieren der entsprechenden $tRNA^{Ser}$-Gipfel ermittelt. Der $tRNA^{Ser}$-Gipfel des Äthanoleluats wurde nicht berücksichtigt.
[a] $tRNA^{Ser}_{3a}$ und $tRNA^{Ser}_{3b}$ wurden zusammen bestimmt.

Im Butylamin-System wandern alle $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten auf Grund ihrer Löslichkeitseigenschaften bevorzugt mit der Oberphase, wie aus den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen ist. $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ wandert etwas weiter als $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$, d.h. sie verhält sich hydrophober als die übrigen Komponenten (Tabelle 8).
Die $tRNA^{Ser}_{3}$-Komponenten sind hydrophiler als die Hauptkomponenten, denn sie befinden sich in den vorderen Fraktionen der Gegenstromverteilungen (Abb. 6 a, Tabelle 7). Nach der Gegenstromverteilung (Abb. 6 a) wurde eine zusätzliche $tRNA^{Ser}$-Komponente gefunden, die in der unfraktionierten tRNA nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 26). Es besteht die Möglichkeit, daß diese

$tRNA^{Ser}_{x}$-Komponente ein Umwandlungsprodukt der Hauptkomponenten ist.

Fraktion	$tRNA^{Ser}_{1\,(-ac)}$	$tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$	$tRNA^{Ser}_{3a}$	$tRNA^{Ser}_{3b}$
Start	6	90	3	1
I	5	71	12	12
II	2	98	-	-
III	15	85	-	-
IV	20	80	-	-
V	30	70	-	-
VI	30	70	-	-
VII	24	76	-	-

Tabelle 8. Relative prozentuale Zusammensetzung der $tRNA^{Ser}$-Fraktionen aus Abb. 6 b.
Bestimmung der Werte wie in Tabelle 7.

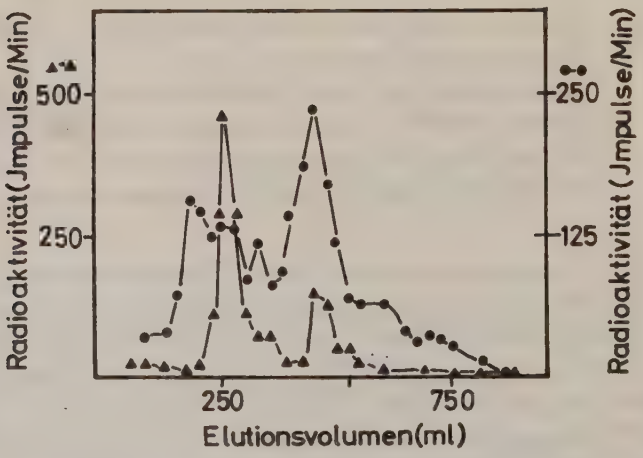

Abb. 26. Cochromatographie von einer angereicherten $tRNA^{Ser}_{3a}$-Fraktion (▲—▲) und der $tRNA^{Ser}$-Fraktion II, Abb. 6 a (●—●).
(●—●) ^{14}C-Seryl-tRNA, (▲—▲) ^{3}H-Seryl-tRNA.

2.4.3. Gegenstromverteilungen im Ammoniumsulfat-System und Isopropanol-Phosphat-System

In diesen beiden Verteilungssystemen wurde das Verhalten der einzelnen Komponenten von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ untersucht. Die drei Fraktionen der Verteilung im Ammoniumsulfat-System (Abb. 6 d) setzen sich wie folgt zusammen:
Fraktion I, die linke Seitenfraktion, enthält 55 - 60 % $tRNA^{Ser}_1$, ungefähr 5 % $tRNA^{Ser}_2$ und 35 - 40 % $tRNA^{Ser}_{2(-ac)}$. Der $tRNA^{Ser}_1$-Anteil wurde durch Entacetylierung bestimmt (vgl. Tabelle 3). Die $tRNA^{Ser}_2$-Menge wurde aus dem Elutionsprofil (Abb. 10 b) abgeschätzt.
Fraktion II, die Mittelfraktion, enthält 30 - 35 % $tRNA^{Ser}_1$, etwa 25 % $tRNA^{Ser}_2$ und ungefähr 40 % $tRNA^{Ser}_{2(-ac)}$ (vgl. 2.1.2.).
Fraktion III, die rechte Seitenfraktion, enthält 20 % $tRNA^{Ser}_1$, 30 % $tRNA^{Ser}_2$ und 50 % $tRNA^{Ser}_{2(-ac)}$. Die $tRNA^{Ser}_1$-Menge wurde durch Entacetylierung bestimmt (vgl. Tabelle 3). Der $tRNA^{Ser}_2$-Anteil wurde aus dem Elutionsprofil (Abb. 10 d) ermittelt.
Die einzelnen Komponenten der $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Fraktion zeigen auf Grund dieser Experimente im Ammoniumsulfat-System folgendes Verhalten: $tRNA^{Ser}_1$ reichert sich bevorzugt in den linken und $tRNA^{Ser}_2$ in den rechten Seitenfraktionen des $tRNA^{Ser}$-Gipfels an. Die $tRNA^{Ser}_{2(-ac)}$-Komponente ist in allen Fraktionen in nahezu gleicher Menge vorhanden.

Die beiden Fraktionen der Verteilung im Isopropanol-Phosphat-System (Abb. 27 b) haben folgende $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung:
Fraktion I enthält etwa 50 % $tRNA^{Ser}_1$, 30 % $tRNA^{Ser}_{2(-ac)}$ und 20 % $tRNA^{Ser}_2$. Oligonucleotidanalysen dieser Fraktion ergaben 50 % $tRNA^{Ser}_1$ und 50 % $tRNA^{Ser}_{2,2(-ac)}$. Der Anteil an $tRNA^{Ser}_2$ wurde aus der Fraktion IV der Abb. 27 c berechnet.
Fraktion II enthält etwa 20 % $tRNA^{Ser}_1$, 10 % $tRNA^{Ser}_{2(-ac)}$ und 70 % $tRNA^{Ser}_2$. Das Verhältnis von $tRNA^{Ser}_1$ zu $tRNA^{Ser}_{2,2(-ac)}$ wurde aus einer Oligonucleotidanalyse bestimmt. Die Menge an $tRNA^{Ser}_2$ wurde aus der Fraktion V der Abb. 27 d berechnet.
Einbauversuche mit reiner Seryl-tRNA-Synthetase haben ergeben, daß die Serin tRNA der FraktionI kein endständiges Adenosin be-

sitzt. Die Serin tRNA der Fraktion II hat ein vollständiges 3'-Ende. Der Doppelgipfel des Verteilungsprofils läßt sich durch dieses Ergebnis erklären (44).

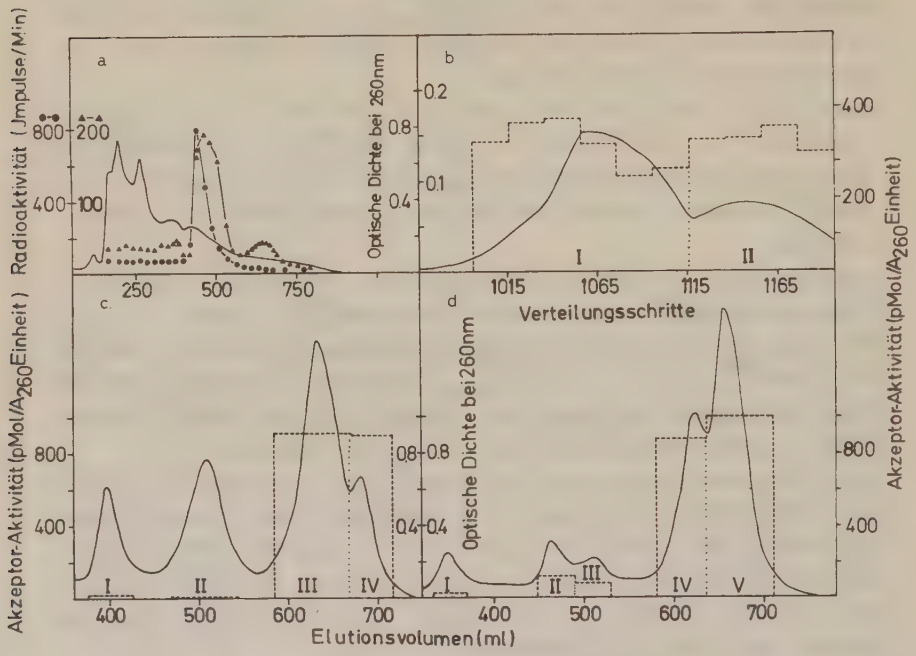

Abb. 27. Trennung von $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$ in einer Gegenstromverteilung im Isopropanol-Phosphat-System.

a) Cochromatographie von ^{14}C-Seryl-$tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$ (●——●) und ^{3}H-Seryl-tRNA (▲——▲) aus unfraktionierter tRNA (Brauerhefe). Diese $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$-Fraktion wurde durch Chromatographie an BD-Cellulose und durch eine Verteilung im Butylamin-System gereinigt.

b) 9 500 A_{260}-Einheiten der angereicherten $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$ wurden durch eine Gegenstromverteilung im Isopropanol-Phosphat-System weiterfraktioniert. Die erste Entnahme der automatischen Apparatur erfolgte nach 480 Vertei-

lungsschritten. Die Verteilung wurde nach 1 215 Verteilungsschritten beendet.

c) 170 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion I aus 27 b) wurden an einer BD-Cellulose-Säule (1 x 50 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.2 - 0.4 M NaCl, 7 M Harnstoff, pH 3.0, je 600 ml.

d) 260 A_{260}-Einheiten tRNA (Fraktion II aus 27 b) wurden wie in Abb. 27 c chromatographiert.
(——) Optische Dichte, (---) Serin-Akzeptoraktivität.

2.4.4. Chromatographie an RPC-4-Säulen

Die angereicherten $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten, die an diesen Säulen chromatographiert wurden, bildeten häufig Aggregate. Das Elutionsprofil von $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ zeigte zwei $tRNA^{Ser}$-Gipfel (Abb. 10 a). Beide tRNA-Fraktionen wurden mit Serin beladen und an Sephadex-G-100-Säulen chromatographiert (Abb. 28 a). Fraktion I, Abb. 10 a, enthielt nur monomere und Fraktion II monomere und dimere $tRNA^{Ser}$-Moleküle (65). Die Aggregate lassen sich auch an MASA- und BD-Cellulose-Säulen von den monomeren $tRNA^{Ser}$-Molekülen abtrennen (Abb. 28 b, c). Die dimeren $tRNA^{Ser}$-Moleküle wurden erst im Äthanolgradienten der BD-Cellulose-Säule eluiert.

Die Chromatographie von $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ an einer RPC-4-Säule ergab drei $tRNA^{Ser}$-Gipfel (Abb. 29 a). Auf Grund der Gelfiltration (Abb. 29 b, c) enthielt Fraktion I nur monomere, Fraktion II nur dimere und Fraktion III sehr wahrscheinlich trimere $tRNA^{Ser}$-Moleküle (65).

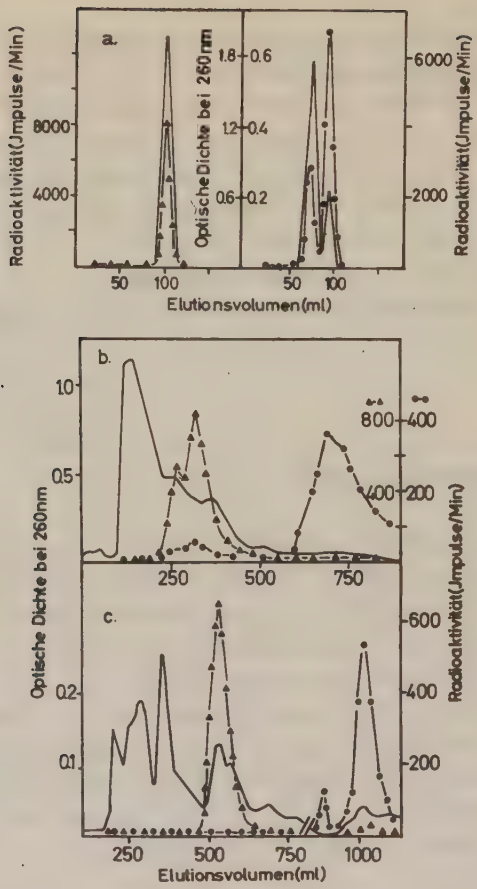

Abb. 28. Trennung von $tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$-Aggregaten.

a) Elutionsprofile von Sephadex-G-100-Säulen (1 x 150 cm), die mit einem Cacodylatpuffer, pH 5.5, eluiert wurden (65).

Links: 20 A_{260}-Einheiten ^{3}H-Seryl-tRNA (Fraktion I, Abb. 10 a).

Rechts: 11.2 A_{260}-Einheiten ^{14}C-Seryl-tRNA (Fraktion II, Abb. 10 a).

Die monomere ^{3}H-Seryl-tRNA wurde mit der dimeren ^{14}C-Seryl-tRNA (erster $tRNA^{Ser}$-Gipfel) vereinigt.

b) Die eine Hälfte dieses Gemisches wurde an einer MASA-Säule chromatographiert (vgl. 4.3.3.).

c) Die andere Hälfte wurde an einer analytischen BD-Cellulose-Säule chromatographiert (vgl. 4.3.2.). Nach 750 ml wurde der Salzgradient durch einen Äthanolgradienten ersetzt: Endpuffer - Endpuffer, der 20 % Äthanol enthielt, je 250 ml.

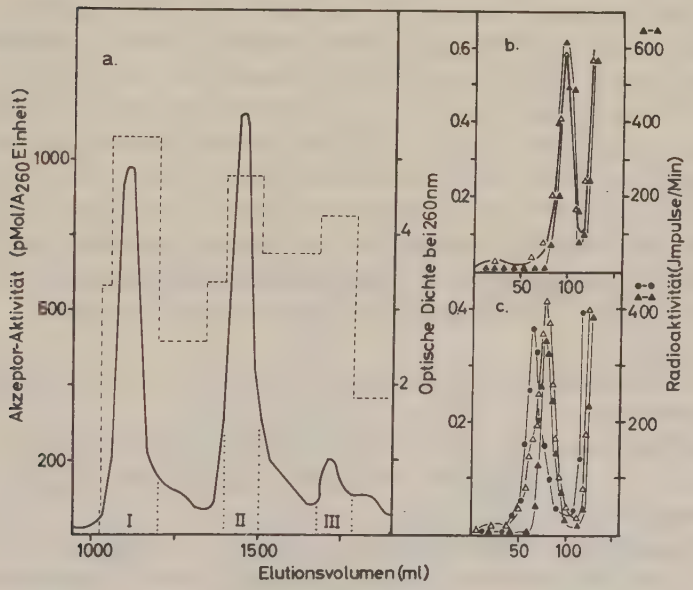

Abb. 29. Entstehung und Charakterisierung von $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$-Aggregaten.

a) 1 325 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ wurden desaggregiert (vgl. Abb. 7 b) und an einer RPC-4-Säule (1 x 240 cm) chromatographiert. Gradient wie in Abb. 10 a.
(——) Optische Dichte, (---) Serin-Akzeptoraktivität.

Chromatographie an Sephadex-G-100-Säulen wie Abb. 28 a.

b) ^{3}H-Seryl-tRNA, Fraktion I.

c) ^{3}H-Seryl-tRNA, Fraktion II und ^{14}C-Seryl-tRNA, Fraktion III.
(△—△) Optische Dichte, (▲—▲) ^{3}H-Seryl-tRNA,
(●—●) ^{14}C-Seryl-tRNA.

2.4.5. Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen in 7 M Harnstoffpuffer

Die Abtrennung von $tRNA_2^{Ser}$ aus dem Gemisch $tRNA_{1,2,2(-ac)}^{Ser}$ und die Anreicherung von $tRNA_{3a}^{Ser}$ und $tRNA_{3b}^{Ser}$ gelang durch Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen in 7 M Harnstoffpuffer, pH 3.0. Auf Grund dieser positiven Ergebnisse wurden die Elutionsprofile aller unfraktionierten tRNAs mit Ausnahme von Prolin tRNA bestimmt (Tabelle 9, Abb. 30 - 33). Die beladenen tRNAs wurden außer Phenylalanyl-tRNA einzeln chromatographiert. Zur vollständigen Elution der tRNAs genügte bei den BD-Cellulose-Säulen in Harnstoffpuffer ein Salzgradient. Mehr als 90 % der eingesetzten tRNA konnten aus dem Säuleneluat zurückgewonnen werden. Vergleicht man die Elutionsprofile aus (59) mit den Abbildungen 30 - 33, so stellt man fest, daß einige tRNAs in beiden Chromatographiemethoden unterschiedliche Elutionseigenschaften aufweisen. Die Anreicherung dieser tRNAs sollte durch Kombination beider Methoden leicht möglich sein.

Die Elutionsprofile einiger Aminoacyl-tRNAs werden im folgenden kurz kommentiert:
Die isoakzeptierenden Alanyl-tRNAs werden bei der Chromatographie in Harnstoffpuffer (Abb. 30) besser aufgetrennt als in Natriumacetatpuffer (59).
Die Auftrennung der $tRNA^{Leu}$-Komponenten ist in beiden Chromatographiemethoden annähernd gleich. Unfraktionierte tRNA wurde mit Ammoniak inkubiert, um $tRNA_3^{Leu}$ (76), die ein N^4-Acetylcytidin (77) enthält, zu entacetylieren. Leider waren die Unterschiede bei der Cochromatographie von unbehandelter und entacetylierter Leucyl-tRNA zu gering, um die $tRNA_3^{Leu}$-Komponente einem Gipfel des Elutionsprofils eindeutig zuordnen zu können.
Methionyl-tRNA zeigt in Abb. 31 nur einen Gipfel, im Gegensatz dazu haben Feldmann et al. (78) bei der Chromatographie in Natriumacetatpuffer drei $tRNA^{Met}$-Fraktionen nachgewiesen, d.h. anscheinend werden die drei $tRNA^{Met}$-Komponenten im Harnstoffpuffer an der gleichen Stelle eluiert.

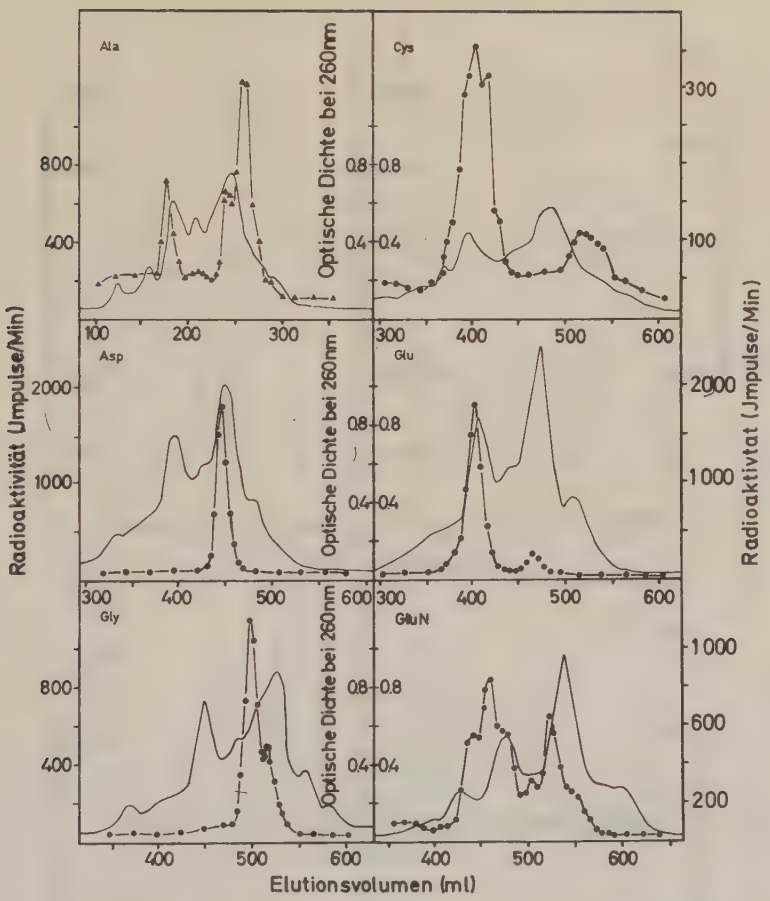

Abb. 30. Chromatographie von Aminoacyl-tRNAs an BD-Cellulose-Säulen in 7M Harnstoffpuffer.
Alle Elutionsprofile wurden mit Ausnahme von $tRNA^{Cys}$ und $tRNA^{GluN}$ doppelt bestimmt, d.h. die unfraktionierte tRNA wurde mit der entsprechenden ^{3}H- bzw. ^{14}C-Aminosäure beladen und einzeln chromatographiert. Gradienten und Isotope der dargestellten Elutionsdiagramme siehe Tabelle 9.
(▲—▲) ^{3}H-Aminoacyl-tRNA, (●—●) ^{14}C-Aminoacyl-tRNA.

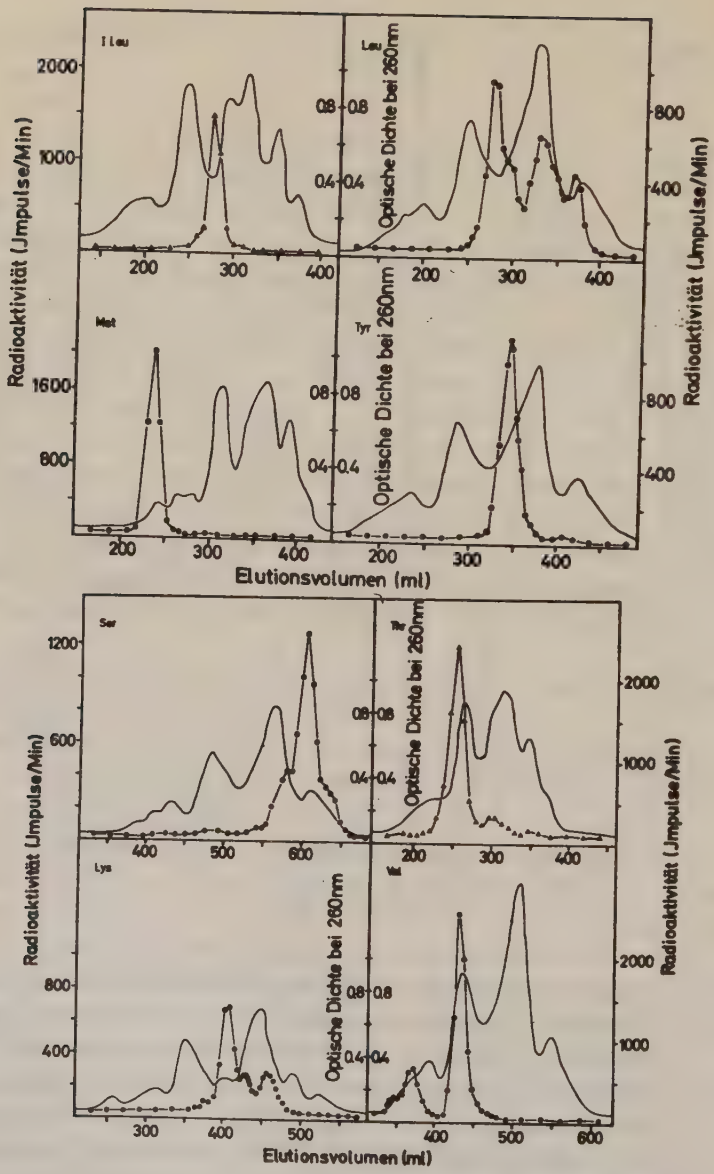

Abb. 31. Chromatographie von Aminoacyl-tRNAs an BD-Cellulose-Säulen in 7 M Harnstoffpuffer.

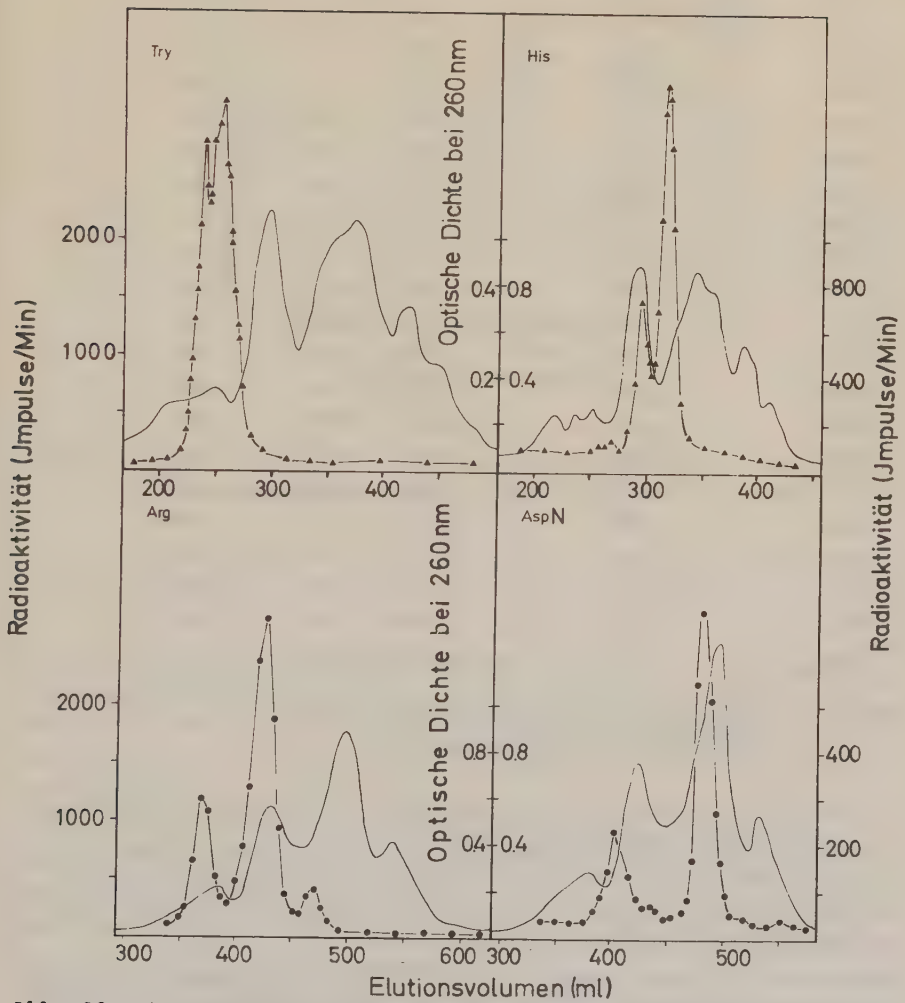

Abb. 32. Chromatographie von Aminoacyl-tRNAs an BD-Cellulose-Säulen in 7 M Harnstoffpuffer.

Die Reinheit von GluN, AspN und Cys wurde nicht überprüft. Es besteht die Möglichkeit, daß ein Teil der Gipfel in diesen Elutionsprofilen auf Verunreinigungen beruht, z. B. könnten die Amide die entsprechenden Dicarbonsäuren enthalten haben.

Aminosäure	Spez. Aktivität (mCi/mMol)	NaCl-Gradient (M)	Volumen (je ml)
^{3}H-Ala	1130	0.22 - 0.37	350
^{14}C-Arg	306	0.20 - 0.45	600
^{14}C-Asp	10	0.20 - 0.45	600
^{14}C-AspN	36.5	0.20 - 0.45	600
^{14}C-Cys	17.1	0.20 - 0.45	600
^{14}C-Glu	15	0.20 - 0.45	600
^{14}C-GluN	42	0.20 - 0.45	600
^{14}C-Gly	10	0.20 - 0.45	600
^{3}H-Ileu	500	0.22 - 0.37	350
^{3}H-His	500	0.22 - 0.37	400
^{14}C-Leu	312	0.20 - 0.45	600
^{14}C-Lys	17.3	0.20 - 0.45	600
^{14}C-Met	60	0.22 - 0.37	350
^{14}C/^{3}H-Phe	475/1530	0.22 - 0.37	400
^{3}H-Ser	3000	0.20 - 0.45	600
^{3}H-Thre	80	0.22 - 0.37	350
^{3}H-Try	1000	0.22 - 0.37	400
^{14}C-Tyr	23.8	0.20 - 0.45	600
^{14}C-Val	24.7	0.20 - 0.45	600

Tabelle 9. Aminosäuren und NaCl-Gradienten der in Abb. 30 - 33 dargestellten Elutionsprofile.

Unfraktionierte Phenylalanyl-tRNA weist im Salzeluat der Abb. 33 drei Gipfel auf. Sehr wahrscheinlich wird unter den sauren Elutionsbdingungen die Y-Base (71) von $tRNA^{Phe}$ teilweise abgespalten, denn im Bereich der ^{14}C-Phenylalanyl-tRNA (HCl) findet man einen mittelgroßen $tRNA^{Phe}$-Gipfel.

Unfraktionierte Seryl-tRNA zeigt bei der Chromatographie in Harnstoffpuffer nur einen Hauptgipfel (Abb. 31), während man in Acetatpuffer vier voneinander abgetrennte $tRNA^{Ser}$-Fraktionen unterscheiden kann (Abb. 2). Die Anreicherung aller $tRNA^{Ser}$-Komponenten sollte sich durch Kombination der beiden Chromatographiemethoden vereinfachen lassen.

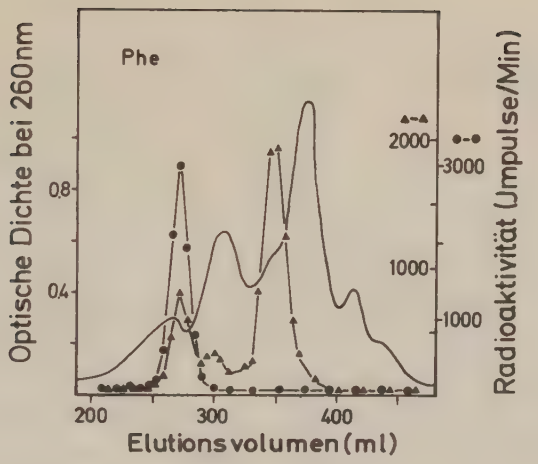

Abb. 33. Cochromatographie von ^{3}H-Phenylalanyl-tRNA (▲—▲) und ^{14}C-Phenylalanyl-tRNA (HCl) (●——●).

2.5. Kinetische Untersuchung der Aminoacylierungsreaktion von Serin tRNAs

Die Bestimmung der Michaelis-Konstante und der maximalen Beladungsgeschwindigkeit wurde bisher mit $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$ durchgeführt (79, 80). Diese Werte sollten auch mit den in den Abschnitten 2.1. und 2.2. getrennten und angereicherten $tRNA^{Ser}$-Komponenten ermittelt werden (Abb. 34).

Folgende Fragen sollten durch die Untersuchungen beantwortet werden: Unterscheiden sich die $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten in ihren K_M- und v_{max}-Werten? Ändern sich diese Werte nach der Abspaltung der Acetylgruppe? Besitzen die $tRNA^{Ser}_3$-Spezies ähnliche Werte wie die $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten?

Aus Tabelle 10 geht hervor, daß die Michaelis-Konstanten und die maximalen Beladungsgeschwindigkeiten der $tRNA^{Ser}_3$-Spezies und der acetylierten und entacetylierten $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten innerhalb der Fehlergrenze gleich sind.

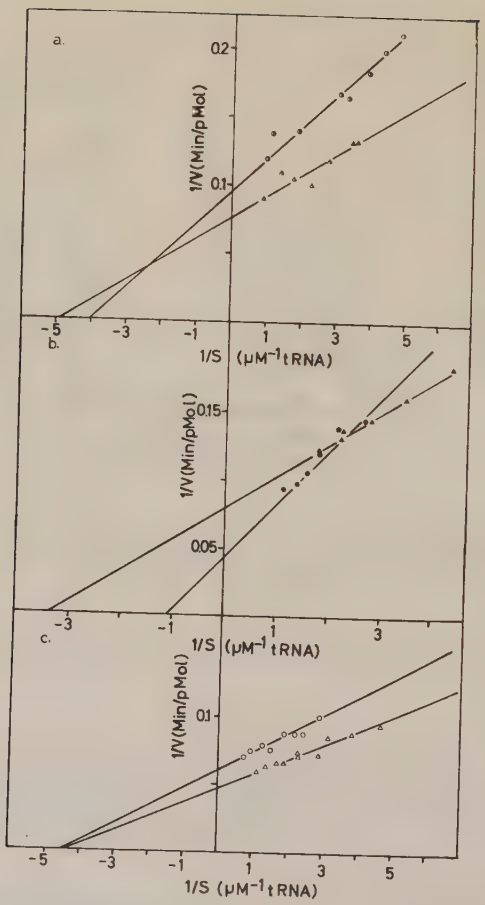

Abb. 34. Lineweaver-Burk-Diagramme der Aminoacylierungsreaktion von Serin tRNAs.

Vergleich von

a) $tRNA_2^{Ser}$ (o——o) aus Bäckerhefe mit $tRNA_2^{Ser}$ (Δ——Δ) aus Brauerhefe,

b) $tRNA_{2\,(-ac)}^{Ser}$ (▲——▲) aus Bäckerhefe mit $tRNA_{1\,(-ac)}^{Ser}$ (●——●) aus Brauerhefe,

c) $tRNA_{3a}^{Ser}$ (Δ——Δ) mit $tRNA_{3b}^{Ser}$ (o——o), beide aus Brauerhefe.

tRNA	K_M µMol	v_{max} pMol/Min.
$tRNA_2^{Ser}$, Brauerhefe	0.20	13.3
$tRNA_2^{Ser}$, Bäckerhefe	0.25	10.6
$tRNA_{1(-ac)}^{Ser}$, Brauerhefe	0.86	26.6
$tRNA_{2(-ac)}^{Ser}$, Bäckerhefe	0.30	12.5
$tRNA_{3a}^{Ser}$, Brauerhefe	0.22	21.2
$tRNA_{3b}^{Ser}$, Brauerhefe	0.22	16.7

Tabelle 10. Konstanten der Aminoacylierungsreaktion von Serin tRNAs (Abb. 34). Das C-C-A-Ende der $tRNA_2^{Ser}$-Komponenten (Bäckerhefe) wurde durch Präinkubation mit C-C-A-Transferase und ATP vollständig rekonstituiert.

2.6. Ribosomenbindungstest der Seryl-tRNAs

Die Bindungsversuche der Seryl-tRNAs wurden mit Polynucleotiden und E. coli-Ribosomen nach der Vorschrift von Nirenberg und Leder (81) durchgeführt (Tabelle 11). $tRNA_2^{Ser}$ aus Bäckerhefe und $tRNA_{1,2,2(-ac)}^{Ser}$ aus Brauerhefe gaben hohe Bindungswerte mit Poly (U,C), die auf Grund ihres Anticodons I-G-A zu erwarten waren. Bindungsexperimente von Nirenberg et al. (82) mit Trinucleotiden haben ergeben, daß $tRNA_2^{Ser}$ aus Bäckerhefe an die Codons U-C-U, U-C-C und U-C-A gebunden wird. Die beiden entacetylierten Komponenten, $tRNA_{1(-ac)}^{Ser}$ und $tRNA_{2(-ac)}^{Ser}$ traten ebenfalls bevorzugt mit Poly (U,C) in Wechselwirkung. Die $tRNA_3^{Ser}$-Komponenten zeigten niedrige, aber signifikante Bindungswerte mit Poly (A,G,C). Es ist anzunehmen, daß diese Spezies die Codons A-G-U und A-G-C in der Proteinbiosynthese übersetzen. Eine $tRNA^{Ser}$-Komponente für das Codon U-C-G konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, denn die $tRNA_x^{Ser}$-Komponente, deren Bindung an das Ribosom von Poly (U_1,C_1) und Poly (C_1,G_1,U_8) stimuliert wurde, gab mit U-C-G keine signifikanten Bindungswerte.

tRNA		Poly(U_1,C_1)	Poly(U_1,C_5)	Poly(U_8,C_1,G_1)	Poly(A_1,C_1,G_1)
$tRNA^{Ser}_2$	, Bäckerhefe	50 (9.2)	-	-	-
$tRNA^{Ser}_{2(-ac)}$	, Bäckerhefe	50 (8.1)	20 (13.3)	-	0 (13.3)
$tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$	, Brauerhefe	40 (8.7)	30 (16.0)	-	0 (16.0)
$tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$	, Brauerhefe	50 (7.1)	-	31 (17.8)	0 (17.8)
$tRNA^{Ser}_{3a}$	, Bäckerhefe	0 (17.1)	2 (5.1)	4 (5.1)	10 (5.1)
$tRNA^{Ser}_{3a}$	, Brauerhefe	0 (6.1)	0 (6.1)	3 (4.1)	12 (4.1)
$tRNA^{Ser}_{3b}$	, Brauerhefe	0 (6.9)	0 (6.9)	3 (6.9)	10 (6.9)
$tRNA^{Ser}_{x}$	, Brauerhefe	43 (4.4)	23 (4.4)	41 (4.4)	0 (4.4)

Tabelle 11. Polynucleotidabhängige Bindung der $tRNA^{Ser}$-Spezies an E. coli-Ribosomen. Die Zahlenwerte entsprechen der prozentualen Bindung von ^{14}C-Seryl-tRNA. Blindwerte ohne Polynucleotid sind subtrahiert. Die Menge der eingesetzten ^{14}C-Seryl-tRNA in pMol pro Test ist in Klammern angegeben.

2.7. $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung der geklonten Hefestämme

Es besteht die Möglichkeit, daß die beobachtete Multiplizität der Serin tRNAs aus Brauer- und Bäckerhefe, z.B. das Vorkommen von $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$ im gekauften, unfraktionierten tRNA-Gemisch, auf verschiedene Hefestämme zurückzuführen ist (83), denn die gekaufte tRNA wird aus einer Hefe isoliert, deren Zusammensetzung schlecht definiert ist. Um diese Vermutung auszuschließen, wurden die Hefestämme, aus denen die Firma Boehringer das unfraktionierte tRNA-Gemisch herstellt, dreimal hintereinander geklont (vgl. 4.3.13.). Die $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung der geklonten Hefestämme wurde durch Chromatographie an analytischen BD-Cellulose-Säulen bestimmt (Abb. 35 und Tabelle 12).

Hefestamm	$tRNA_1^{Ser}$	$tRNA_2^{Ser}$	$tRNA_{3a}^{Ser}$	$tRNA_{3b}^{Ser}$
Brauerhefe	38	41	8	13
Bäckerhefe B	-	85	3	12
Bäckerhefe L	-	87	3	10

Tabelle 12. $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung der geklonten Hefestämme. Die relativen prozentualen Werte wurden durch Planimetrieren der entsprechenden $tRNA^{Ser}$-Gipfel bestimmt (Abb. 35). Der Anteil an $tRNA_1^{Ser}$ wurde durch Ammoniakinkubation erhalten.

Im tRNA-Gemisch der geklonten Brauerhefe wurden die gleichen $tRNA^{Ser}$-Spezies nachgewiesen, wie in der unfraktionierten, gekauften tRNA: $tRNA_1^{Ser}$, $tRNA_2^{Ser}$, $tRNA_{3a}^{Ser}$ und $tRNA_{3b}^{Ser}$. Die $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten waren unter den angewandten Wachstums- und Isolierungsbedingungen vollständig acetyliert. Die Trennung von $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$ sollte mit diesem Gemisch einfacher durchführbar sein, da die $tRNA_{2\,(-ac)}^{Ser}$-Komponente fehlt, die die gleichen Chromatographieeigenschaften wie $tRNA_1^{Ser}$ besitzt. Die Anteile der $tRNA_{3a}^{Ser}$- und $tRNA_{3b}^{Ser}$-Komponenten waren in der geklonten Brauerhefe

und in der gekauften tRNA unterschiedlich. Die $tRNA_x^{Ser}$-Komponente konnte in dem tRNA-Gemisch der geklonten Brauerhefe nicht nachgewiesen werden.
Die beiden geklonten Bäckerhefen besaßen die gleiche $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung, keine der beiden enthielt $tRNA_1^{Ser}$. Außer $tRNA_2^{Ser}$ und $tRNA_{3a}^{Ser}$, die in der unfraktionierten, gekauften tRNA gefunden wurden (Abb. 16) trat in der geklonten Bäckerhefe noch zusätzlich $tRNA_{3b}^{Ser}$ auf (Abb. 35).

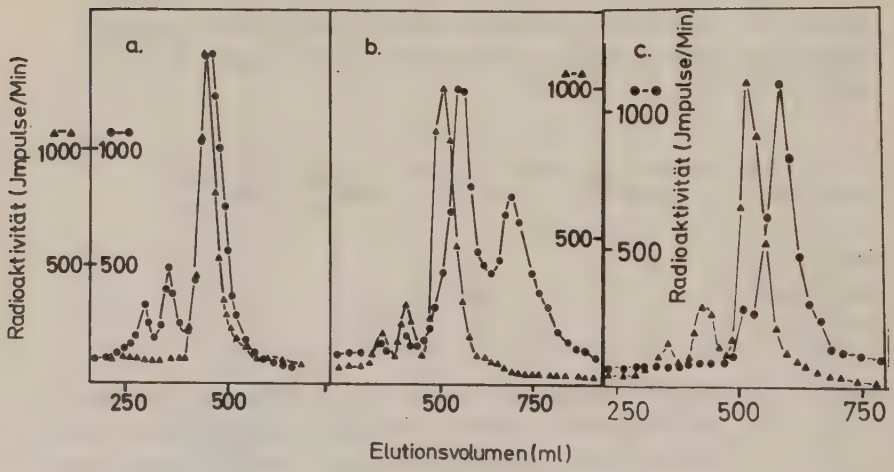

Abb. 35. Charakterisierung der $tRNA^{Ser}$-Fraktion aus geklonter Hefe an analytischen BD-Cellulose-Säulen.
a) Cochromatographie von ^{14}C-Seryl-tRNA aus Brauerhefe und angereicherter ^{3}H-Seryl-$tRNA_2^{Ser}$ aus Bäckerhefe (nicht geklont).
b) Cochromatographie von Seryl-tRNA aus Brauerhefe (●——●) nach Ammoniakinkubation, (▲——▲) vor Ammoniakinkubation.
c) Cochromatographie von Seryl-tRNA aus Bäckerhefe, Typ L. Behandlung und radioaktive Markierung wie in b. (●——●) ^{14}C-Seryl-tRNA, (▲——▲) ^{3}H-Seryl-tRNA.

2.8. $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung der Bäckerhefe nach Sporulation

Die in den geklonten Hefestämmen beobachtete Multiplizität der Serin tRNAs beruht auf der genetischen Information einer Stammzelle, die einen polyploiden, sehr wahrscheinlich triploiden Chromosomensatz besitzt (55). Durch Sporulation läßt sich der Polyploidiegrad der Hefezellen reduzieren. Von den drei geklonten Hefestämmen (vgl. 2.7.) bildeten die beiden Bäckerhefen Sporen in guter Ausbeute; die Sporulation der Brauerhefe konnte nicht induziert werden, obwohl sie mit verschiedenen Präsporulations- und Sporulationsmedien (84) inkubiert wurde. Mehrere Sporentetraden der Bäckerhefe wurden mit dem Mikromanipulator getrennt.

Sporen	α S288C	a D587-2A	Paarungstyp
L-1A	+	-	a
L-1B	+	-	a
L-1C	-	-	
L-1D	-	-	
L-2A	+	-	a
L-2B	+	-	a
L-2C	-	-	
L-2D	-	-	

Tabelle 13. Bestimmung des Paarungstyps von Sporen der Bäckerhefe, Typ L, durch Inkubation mit haploiden Hefestämmen.

Von zwei Tetraden, bei denen alle Sporen eine Kolonie bildeten, wurden Stammkulturen angelegt. Proben dieser Stammkulturen wurden mit definierten, haploiden Hefestämmen inkubiert, um durch Zygotenbildung den Paarungstyp zu ermitteln (85, 86). Jeweils zwei Sporen von beiden Tetraden besaßen den Paarungstyp a, während die übrigen Sporen keine Zygoten bildeten (Tabelle 13). Die Sporulation der zuletzt genannten Hefestämme konnte ein zweites Mal induziert werden.

Die Zusammensetzung der $tRNA^{Ser}$-Fraktion von den acht Stämmen der ersten Sporulation wurde durch Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen bestimmt. Es zeigte sich, daß in allen acht Hefestämmen, deren Genom durch die Sporulation um einen Chromosomensatz reduziert worden war, qualitativ und quantitativ die gleichen $tRNA^{Ser}$-Spezies vorkamen wie in dem Ausgangsstamm.

3. Diskussion

Die Fraktionierungen und Analysen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestätigen die früheren Ergebnisse, daß in der Brauerhefe zwei Hauptkomponenten $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$ (13) und in der Bäckerhefe eine Hauptkomponente $tRNA_2^{Ser}$ (53) vorkommen.

Die Oligonucleotidanalyse der T1-RNase-Spaltung zeigt, daß die $tRNA_2^{Ser}$-Komponente aus Bäckerhefe (Abb. 18) vollständig acetyliert ist, im Gegensatz dazu war die $tRNA_2^{Ser}$-Spezies aus amerikanischer Bäckerhefe (53) nur teilweise acetyliert. Die angereicherte $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Fraktion aus Brauerhefe ist zu 60 % acetyliert. Analysen der $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten aus Brauerhefe von verschiedenen Anreicherungen, die im Abstand von mehreren Jahren durchgeführt wurden, ergaben ähnliche Werte für den Acetylcytidingehalt. Da die $tRNA_2^{Ser}$-Komponente aus Bäckerhefe vollständig acetyliert ist, kann der niedrige Acetylierungsgrad der $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten aus Brauerhefe kein Artefakt der tRNA-Isolierung sein. Er hängt anscheinend von den Wachstumsbedingungen der Hefe ab. In geklonter Brauerhefe, die in Vollmedium (87) unter starker Belüftung gezüchtet wurde und die am Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet wurde, sind $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$ vollständig acetyliert (Abb. 35 a).

Brauerhefe und geklonte Bäckerhefe besitzen zwei Nebenkomponenten $tRNA_{3a}^{Ser}$ und $tRNA_{3b}^{Ser}$ für die Übersetzung der Codons A-G-C und A-G-U. Sehr wahrscheinlich sind diese Spezies identisch mit den $tRNA^{Ser}$-Fraktionen, die in früheren Anreicherungen (48 - 50) zusätzlich zu den Hauptkomponenten beobachtet, bisher jedoch nicht näher charakterisiert wurden. Es besteht die Möglichkeit, daß $tRNA_{3b}^{Ser}$ die entacetylierte Form von $tRNA_{3a}^{Ser}$ ist, denn nach Ammoniakinkubation erscheint $tRNA_{3a}^{Ser}$ an der gleichen Stelle im Elutionsprofil einer analytischen BD-Cellulose-Säule wie $tRNA_{3b}^{Ser}$ (Abb. 34 c). Gegen diese Interpretation des Elutionsdiagramms spricht die Beobachtung, daß in den geklonten Hefestämmen, die nur vollständig acetylierte $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten enthalten, beide $tRNA_3^{Ser}$-Komponenten gefunden werden. $tRNA_{3a}^{Ser}$ ist weder Vorstufe noch Umwandlungsprodukt der Hauptkomponenten, denn das

Oligonucleotidmuster der T1-RNase-Spaltung (Abb. 14) unterscheidet sich signifikant von den entsprechenden Elutionsprofilen der Hauptkomponenten. Es ist unwahrscheinlich, daß die beiden $tRNA_3^{Ser}$-Komponenten aus den Mitochondrien stammen, denn es ist kaum anzunehmen, daß bei der Proteinbiosynthese im Cytoplasma nur die vier UC-haltigen Codons benutzt werden.

Die $tRNA_x^{Ser}$-Komponente wurde in Fraktionen von Gegenstromverteilungen der $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten aus Brauerhefe gefunden. Die Ribosomenbindung von $tRNA_x^{Ser}$ wird von UC-haltigen Polynucleotiden stimuliert. Vielleicht ist diese Komponente für die Übersetzung des Codons U-C-G notwendig; Ribosomenbindungsversuche mit Trinucleotiden, die diese Frage entscheiden sollten, ergaben keine eindeutigen Bindungswerte. Da $tRNA_x^{Ser}$ weder in unfraktionierter, gekaufter tRNA noch in der tRNA aus geklonter Hefe gefunden wurde, besteht die Möglichkeit, daß diese Komponente durch Umwandlung aus den $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten im Verlauf der Gegenstromverteilungen entsteht.

Das Mengenverhältnis der $tRNA^{Ser}$-Komponenten, die verschiedene Codons erkennen, ist in Brauer- und Bäckerhefe gleich. Etwa 80 % der $tRNA^{Ser}$-Fraktion entspricht den Hauptkomponenten, 20 % den $tRNA_3^{Ser}$-Komponenten. Die Hauptfraktion der Brauerhefe besteht aus gleichen Anteilen an $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$. In anderen Organismen werden die $tRNA^{Ser}$-Komponenten für die verschiedenen Codons ebenfalls in unterschiedlicher Konzentration synthetisiert (82). Die bisher untersuchten Organismen sind in der Lage, alle sechs Serin Codons zu übersetzen (33, 45, 47). Eine $tRNA^{Ser}$-Spezies für das Codon U-C-G konnte in Hefe nicht eindeutig nachgewiesen werden. Obwohl der genetische Code universell ist, scheinen die einzelnen Organismen keineswegs alle Codons im gleichen Ausmaß zu benutzen.

Drei der vier $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten $tRNA_{1(-ac)}^{Ser}$, $tRNA_2^{Ser}$ und $tRNA_{2(-ac)}^{Ser}$ wurden durch Kombination von verschiedenen Fraktionierungsmethoden in reiner Form hergestellt. Das Gemisch aus $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_{2(-ac)}^{Ser}$ konnte nicht getrennt werden. Reine, voll-

ständig acetylierte $tRNA_1^{Ser}$ sollte man aus der tRNA der geklonten Brauerhefe isolieren können, die keine $tRNA_{2(-ac)}^{Ser}$-Komponente enthält.
$tRNA_{3a}^{Ser}$, $tRNA_{3b}^{Ser}$ und $tRNA_x^{Ser}$ waren zu 50 % rein und von den anderen $tRNA^{Ser}$-Komponenten abgetrennt.

Im Ribosomenbindungstest konnte kein Unterschied zwischen den vollständig acetylierten und nicht acetylierten $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten gefunden werden, d.h. die Acetylgruppe hat keinen Einfluß auf die Bindungsaktivität.
Die Michaeliskonstanten und die maximalen Beladungsgeschwindigkeiten von $tRNA_{1(-ac)}^{Ser}$, $tRNA_2^{Ser}$ und $tRNA_{2(-ac)}^{Ser}$ sind auf Grund der kinetischen Untersuchungen der Aminoacylierungsreaktion für alle Komponenten gleich, daraus folgt, daß die Acetylgruppe und die drei Nucleotidaustausche zwischen $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$ für die Erkennung der Seryl-tRNA-Synthetase nicht essentiell sind.
Die Frage nach der biologischen Bedeutung des N^4-Acetylcytidins, das in mehreren tRNAs (47, 77, 88) gefunden wurde, bleibt weiterhin unbeantwortet. Die Isolierung des acetylgruppenübertragenden Enzyms könnte zur Lösung dieses Problems beitragen. Als Test für die Fraktionierung dieses Enzyms könnte die Verschiebung von nicht acetylierter und acetylierter $tRNA_1^{Ser}$ im Elutionsprofil der analytischen BD-Cellulose-Säulen verwendet werden.

Unfraktionierte tRNA, die aus geklonter Brauerhefe isoliert wurde, enthält die gleichen $tRNA^{Ser}$-Komponenten wie die gekaufte tRNA. Die $tRNA^{Ser}$-Fraktion der geklonten Bäckerhefe besteht aus $tRNA_2^{Ser}$, $tRNA_{3a}^{Ser}$ und $tRNA_{3b}^{Ser}$; sie enthält im Gegensatz zur gekauften tRNA noch zusätzlich $tRNA_{3b}^{Ser}$. Die Gründe für das Auftreten von $tRNA_{3b}^{Ser}$ in der geklonten Bäckerhefe wurden nicht untersucht. Vielleicht ist die Synthese von $tRNA_{3b}^{Ser}$ auf die optimalen Wachstumsbedingungen zurückzuführen, denn auch in der geklonten Brauerhefe ist der $tRNA_{3b}^{Ser}$-Anteil wesentlich höher als in dem gekauften tRNA-Gemisch.
Die beobachtete Multiplizität der Serin tRNAs beruht auf der genetischen Information eines polyploiden Stammes der Brauer- bzw. Bäckerhefe.

Die durch Sporulation erhaltenen Stämme der Bäckerhefe haben qualitativ und quantitativ die gleiche $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung wie der Ausgangsstamm, obwohl ihr Genom um einen Chromosomensatz reduziert ist. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die untersuchte Bäckerhefe bereits im haploiden Genom die genetische Information für sämtliche $tRNA^{Ser}$-Komponenten besitzt.

4. Experimenteller Teil

4.1. Materialien

4.1.1. tRNAs, Nucleotide

Unfraktionierte tRNA aus Bäcker- und Brauerhefe wurde von der Fa. Boehringer Mannheim GmbH bezogen. Ein Teil der $tRNA^{Ser}$-Fraktion, die zur Anreicherung von $tRNA^{Ser}_{1(-ac)}$ verwendet wurde, stammte aus Fraktionierungen von S. Notz und H.G. Zachau. In die Gegenstromverteilung, Abb. 6 b, wurden zusätzlich zu eigenen noch analoge, von H. Feldmann zur Verfügung gestellte $tRNA^{Ser}$-Fraktionen eingesetzt.
Die tRNAs aus den drei geklonten Hefestämmen wurden nach der Vorschrift von Monier et al. (89) isoliert. Die Hefen: 1. Brauerhefe, der Fa. Bräuwastl, Weilheim 2. Bäckerhefe Typ B (Trockenhefe) und 3. Bäckerhefe Typ L (Suspension in Wasser) wurden von der Firma Boehringer, Tutzing zur Verfügung gestellt. Aus diesen Hefen isoliert die Firma Boehringer die oben erwähnten unfraktionierten tRNAs.
ATP wurde von der Fa. Zellstoff Waldhof und CTP von der Fa. Boehringer Mannheim GmbH bezogen. Das 2', 3'-Cyclophosphat von ac^4C (90) wurde von H. Feldmann synthetisiert. Es wurde mit Pankreas-RNase inkubiert und durch Papierelektrophorese bei pH 3.5 (75) gereinigt.
Die Polynucleotide für den Ribosomenbindungstest wurden von der Fa. Miles Chemical Co., Elkhart Ind. gekauft.

4.1.2. Enzyme

Das unfraktionierte Gemisch der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (EC 6.1.1) wurde von R. Hirsch aus Brauerhefe durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung (45 - 67 % Sättigung) isoliert. 200 - 300fach angereicherte Seryl-tRNA-Synthetase (EC 6.1.1.11) wurde ebenfalls von R. Hirsch zur Verfügung gestellt. Die spezifische Aktivität dieses Enzyms betrug 42 mEinheiten/A_{280}-Einheit; Definition der Einheit und Aktivitätstest in (91).

C-C-A-Transferase (EC 2.7.7.25) wurde von H. Overath aus Brauerhefe isoliert und zur Verfügung gestellt. Das verwendete Enzym war etwa 125fach angereichert und besaß eine Aktivität von 15 mEinheiten/A_{280}-Einheit; Definition der Einheit und Aktivitätstest in (92).
T1-Ribonuclease (EC 2.7.7.26) wurde von der Fa. Sankyo, Tokio, bezogen; Definition der Einheit und Aktivitätstest in (93).
Pankreas-Ribonuclease (EC 2.7.7.16) war ein Produkt der Fa. Boehringer Mannheim GmbH und besaß eine Aktivität von 40 Einheiten/mg; Definition der Einheit in (94).
Alkalische Phosphomonoesterase (EC 3.1.3.1) aus E. coli wurde von Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J., bezogen und hatte nach Reinigung (95) die spezifische Aktivität 40 Einheiten/mg; Aktivitätstest in (96).
Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1) wurde von H. Feldmann aus dem Gift von Crotalus adamanteus nach (97) isoliert. Das verwendete Präparat hatte 850 Einheiten/ml; Aktivitätstest und Definition der Einheit in (98).

4.1.3. Adsorbentien für Säulenchromatographie

DEAE-Cellulose (0.6 - 1.2 mäq./g) wurde von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, bezogen.
DEAE-Sephadex A-25 und A-50 (3.5 mäq./g) waren Produkte der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden.
Sephadex G-25 und G-100 wurden ebenfalls von der Fa. Pharmacia, Uppsala, bezogen.
Benzoylierte DEAE-Cellulose (BD-Cellulose) wurde nach der Vorschrift von Gillam et al. (59) hergestellt oder von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, gekauft.
Das Kationenaustauscherharz AG 50W-X8 von Bio Rad wurde von der Fa. Calbiochem, Los Angeles, bezogen.
Chromosorb W (80 - 100 mesh) war ein Produkt der Fa. Johns Manville Corp., Celite Div., gekauft wurde es von der Fa. Lehmann und Voß, Hamburg.

4.1.4 Reagentien

Chemikalien waren, wenn nicht anders angegeben, von der Fa. E. Merck, Darmstadt;Reinheitsgrad p.A.
Aliquat 204 (Dimethyldilaurylammonium-Chlorid) wurde von der Fa. General Mills, Kankakee, Ill., zur Verfügung gestellt. Trioctylpropylammonium-Bromid wurde von der Fa. Kodak Corp. gekauft.
Tri-n-butylamin wurde gereinigt (13). Di-n-butyläther, Isopropanol und Butanol wurden vor der Verteilung destilliert.
Cetavlon (Cetyltrimethylammonium-Chlorid) war ein Produkt der Fa. Suchardt, München.
Cacodylsäure (The British Drug Hauses Ltd.) wurde aus Äthanol : Wasser (1 : 1) umkristallisiert.
Das Rinderalbumin (Albumin Bovine Fraktion V) zur Herstellung des Methylalbumins (99) wurde von der Nutritional Biochem. Corp., Cleveland, Ohio, bezogen.
Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid und Veronal wurden von der Fa. Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, gekauft.
"Stains all" (100) wurde von der Fa. Eastman Kodak, Rochester, N.Y. gekauft.
Der Hefeextrakt für die Nährmedien war ein Produkt der Fa. Oxoid Ltd., London. Casamino acids war von Difco Laboratories, Detroit, Mich..
Omnifluor wurde von der New England Nuclear Corp., Boston, Mass., bezogen. Toluol und Dioxan wurden vor Gebrauch absolutiert.
^{14}C- und ^{3}H-Aminosäuren wurden von der Fa. New England Nuclear Corp., Boston, Mass., oder von der Fa. Radiochemical Centre, Amersham, gekauft. ^{14}C-ATP war von der Fa. Radiochemical Centre, Amersham.

4.2. Apparative Hilfsmittel

Zur Messung der UV-Absorption wurde entweder ein Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss, Oberkochen, oder ein registrierendes Spektralphotometer Modell 15 der Fa. Cary Instruments, Monrovia, Calif., benutzt.
Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem Flüssigkeitsszintil-

lationszähler (Tri-Carb Modelle 3310 und 3375) der Fa. Packard Instruments, Inc., La Grange, Ill., durchgeführt.
Die T1-RNase Spaltungen erfolgten unter Konstanthaltung des pH-Wertes mit einem Autotitrator der Fa. Radiometer, Kopenhagen.
Zur Gelelektrophorese wurde die Elektrophoresekammer EC 490 der Fa. E-C Apparatus Corp., Philadelphia, verwendet. Die Densitogramme der Gele wurden mit einem umgebauten Photometer der Fa. Zeiss, Oberkochen, bei der Wellenlänge 546 mμ aufgenommen.
Die Fraktionssammler waren von der Fa. LKB-Produkter, Stockholm (Ultrarac 7000).
Kühlzentrifugen der Firmen M. Christ, Osterode, und Sorvall, Norwalk, Conn., (Modell RC2-B) wurden benutzt. Die Ribosomenpräparation wurde in einer Ultrazentrifuge (spinco L2 65b) der Fa. Beckman Instruments GmbH, München, durchgeführt.
Handapparaturen der Fa. Bühler, Tübingen, wurden für die Gegenstromverteilungen im Butylaminsystem verwendet. Die große Apparatur hatte 23 Verteilungselemente zu je 300 ml Ober- und Unterphase, die kleine 42 Verteilungselemente zu je 50 ml Ober- und Unterphase.
Die Verteilungen im Ammoniumsulfat- und Isopropanol-Phosphat-System wurden in der automatischen Apparatur der Fa. E-C Apparatus Corp., Philadelphia, durchgeführt. Die Anzahl der Verteilungselemente betrug 300 (je 10 ml Ober- und Unterphase).

4.3. Methoden

4.3.1. Vorbereitung von Ionenaustauschern

DEAE-Cellulose wurde 10 - 15 Min. in 0.5 N Natronlauge gerührt, abgesaugt und mit destilliertem Wasser neutral gewaschen. Anschließend wurde die Cellulose je nach Verwendungszweck entweder mit 1 M NaCl in die Cl^--Form oder mit 1 M $(NH_4)_2CO_3$, pH 8.6, in die HCO_3^--Form übergeführt, abgesaugt und drei-bis fünfmal mit dem Startpuffer des jeweiligen Gradienten gewaschen. Zuletzt wurde zweimal in Startpuffer geschlämmt.
BD-Cellulose wurde vor Gebrauch mit 95 %igem Äthanol gewaschen, bis das Eluat, das am Anfang gelb war, farblos blieb. Anschließend

wurde die BD-Cellulose mit dem Startpuffer des jeweiligen Gradienten mehrmals gewaschen.
DEAE-Sephadex A-25 wurde in einem großen Überschuß des Startpuffers (0.25 M NaCl, 10 mM Ammoniumformiat pH 3.2) zur Quellung gebracht. In einem Zeitraum von 24 Stunden wurde die überstehende Lösung drei- bis viermal durch neuen Puffer ersetzt.
DEAE-Sephadex A-50 wurde nach der Vorschrift von Nishimura et al. (61) gewaschen und äquilibriert.
Bei RPC-4-Säulen wurde Chromosorb mit Dimethyldilaurylammonium-Chlorid und bei RPC-3-Säulen mit Trioctylpropylammonium-Bromid überzogen (62). Auf eine gleichmäßige Verteilung der organischen Phase wurde geachtet. Die Säulen wurden mit 2 - 3 Säulenvolumina Startpuffer äquilibriert.
Das Kationenaustauscherharz AG 50W-X8 wurde zweimal mit 0.5 N Natronlauge und anschließend mit Wasser gewaschen. Das Harz wurde mit 0.5 N Salzsäure in die H^+-Form übergeführt und dann mit Wasser so lange gewaschen, bis der Durchlauf neutral war. Das Austauscherharz wurde nach dieser Behandlung sofort verwendet.

4.3.2. Chromatographie von aminoacylierten tRNAs an BD-Cellulose

Analytische BD-Cellulose-Säulen in Natriumacetatpuffer

50 000 - 100 000 Impulse/Min. von ^{14}C- und/oder ^{3}H-Seryl-tRNA wurden zusammen mit 50 - 100 A_{260}-Einheiten unfraktionierter tRNA chromatographiert. Die analytische BD-Säule (1 x 50 cm) wurde mit einem linearen Gradienten eluiert: 0.5 - 1.2 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, je 750 ml. Das Fraktionsvolumen betrug 5.5 ml. Nach 1 000 bis 1 200 ml wurde der Salzgradient durch ein Gemisch aus Endpuffer und 20 %igem Äthanol ersetzt. Die Hauptmenge der tRNA und der Radioaktivität konnte im Eluat des Salzgradienten nachgewiesen werden. In den ersten drei bis fünf Fraktionen des Äthanoleluats wurde immer eine starke Zunahme der Extinktion und der Radioaktivität beobachtet. Anscheinend handelte es sich um einen unspezifischen Adsorptionseffekt der BD-Cellulose, denn in den darauffolgenden Fraktionen nahmen beide Werte wieder sehr schnell ab. Von jeder vierten

Fraktion des Eluats wurde 1 ml entnommen, in 10 ml Bray-Szintillatorgemisch (101) pipettiert und im Szintillationsspektrometer bei diskriminierender Einstellung gemessen. Bei Doppelmarkierung wurden die ^{3}H- und ^{14}C-Kurven aus den erhaltenen Impulsen/Min. nach der Formel aus (102) berechnet.

Analytische BD-Cellulose-Säulen in 7 M Harnstoffpuffer

Etwa 100 000 Impulse/Min. von ^{14}C- und/oder ^{3}H-Aminoacyl-tRNA wurden zusammen mit 100 A_{260}-Einheiten unfraktionierter tRNA chromatographiert. Die Elutionsprofile von 19 Aminoacyl-tRNAs (ausgenommen Prolin) wurden bestimmt. Die analytische BD-Säule (1 x 50 cm) wurde mit einem linearen Gradienten eluiert: 0.2 - 0.45 M NaCl, 7 M Harnstoffpuffer, pH 3.0, je 600 ml. In einigen Fällen wurde ein entsprechend kürzerer Gradient verwendet (vgl. 2.4.5.). Das Fraktionsvolumen betrug 2.1 ml. Bei diesem Säulentyp wird die gesamte tRNA bereits im Salzgradienten eluiert. Von jeder vierten Fraktion des Eluats wurde 1 ml entnommen, entweder in 10 ml Bray-Szintillatorgemisch oder in 10 ml Triton-Szintillatorgemisch (103) pipettiert und im Szintillationsspektrometer gemessen. Bei Doppelmarkierung wurden die ^{3}H- und ^{14}C-Kurven aus den erhaltenen Impulsen/Min. nach der Formel aus (102) berechnet.

4.3.3. Chromatographie von Seryl-tRNAs an MASA-Säulen

Methyliertes Albumin wurde nach (99) hergestellt und auf Kieselsäure niedergeschlagen (74). 50 000 - 100 000 Impulse/Min. von ^{14}C- und ^{3}H-Seryl-tRNA wurden zusammen mit unfraktionierter tRNA (insgesamt 120 A_{260}-Einheiten) chromatographiert. Nachdem die tRNA auf die Säule aufgezogen war, wurde mit 50 ml Ausgangspuffer nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.7 - 1.15 M NaCl, 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.5, je 400 ml. Das Fraktionsvolumen betrug 3 ml. Von jeder vierten Fraktion des Eluats wurde 1 ml entnommen, in 10 ml Bray-Szintillatorgemisch pipettiert und im Szintillationsspektrometer bei diskriminierender Einstellung gemessen. Bei Doppelmarkierung wurden die erhal-

tenen Impulse/Min. nach der Formel (102) korrigiert.

4.3.4. Gelfiltration an Sephadex G-100 und G-25

Sephadex G-100 wurde in 50 mM KH_2PO_4-Puffer, pH 6.8, aufgekocht. Nach 3 Stunden wurde der Puffer abgegossen. Das Säulenmaterial wurde fünfmal mit Wasser nachgewaschen, mehrmals in Cacodylatpuffer geschlämmt und 24 Stunden bei 4 ^{o} mit dem gleichen Puffer äquilibriert. Die Sephadex-G-100-Säulen (1 x 150 cm) wurden mit Cacodylatpuffer eluiert (65): 0.15 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 10 mM Cacodylatpuffer, pH 7.0. Bei der Chromatographie von Seryl-tRNA wurde der gleiche Puffer bei pH 5.5 verwendet. Die Sephadex-G-25-Säulen (1 x 25 cm) wurden zur Reinigung von präparativen Beladungen benutzt. Ihre Elution erfolgte mit einem 10 mM KH_2PO_4-Puffer, pH 5.8. Mit diesen Säulen konnten bis zu 50 A_{260}-Einheiten tRNA von der freien Aminosäure und ATP abgetrennt werden.

4.3.5. tRNA-Fraktionierung mit Gegenstromverteilungen

Gegenstromverteilung im Tri-n-butylamin-System

Unfraktionierte tRNA wurde mit einer Natriumcarbonatlösung digeriert, mit Salzsäure gefällt und in das Tri-n-butylaminsalz übergeführt. Säurefällung und Überführung der tRNA in das Butylaminsalz wurden einmal wiederholt. Die Verteilungen wurden in dem beschriebenen Lösungsmittelsystem durchgeführt (56), der Butyläthergehalt wurde variiert, z.B. enthält ein 25er System 25 Teile Di-n-butyläther auf 100 Teile n-Butanol. Die Verteilungen erfolgten in Handapparaturen (vgl. 4.2.). Waren alle Verteilungselemente der Apparatur gefüllt, wurde die am weitesten gewanderte Oberphase entnommen, dadurch konnte die Anzahl der Verteilungsschritte erhöht werden. Die tRNA wurde durch Äthanolfällung unter Zusatz von Kaliumacetat (ad 2 %) isoliert.

Gegenstromverteilungen im Ammoniumsulfat-System und Isopropanol-Phosphat-System

In diese Verteilungen wurden angereicherte $tRNA^{Ser}$-Fraktionen eingesetzt. Da die tRNA in diesen Lösungsmittelsystemen (57) leicht ausfiel, mußten mehrere Lösungsversuche durchgeführt werden. Die sich in der Zwischenphase absetzende tRNA wurde gegen Wasser dialysiert, in Cacodylatpuffer desaggregiert (65) und von neuem gelöst. Die Verteilungen wurden in der automatischen Apparatur (vgl. 4.2.) durchgeführt. Nach 500 - 600 Verteilungsschritten wurden die Randfraktionen des tRNA-Profils abgetrennt. Die Hauptmenge der tRNA wurde mit frischem Lösungsmittelsystem weiterverteilt. Die tRNA wurde aus den Salzlösungen durch Flotation mit Cetavlon isoliert (13).

4.3.6. Derivatisierung von Seryl-tRNA

Die optimalen Bedingungen für die präparative Beladung der $tRNA^{Ser}_{1,2,2(-ac)}$-Fraktion wurden in einem Vorversuch durch Variation der Enzym-, ATP- und Aminosäure-Konzentration bestimmt. Pro 100 A_{260}-Einheiten tRNA wurden 0.4 ml ATP-Standardgemisch (0.1 M ATP, 0.15 M $MgCl_2$, 0.25 M Tris/HCl, pH 7.5), 0.4 ml ^{3}H-Serin (L-Serin 0.5 µMol/ml) und 0.2 ml unfraktioniertes Synthetasegemisch zugegeben und mit Cacodylatpuffer, pH 7.0 (65), auf 3 ml aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte 20 Min. bei 37 °. Die Aminoacylierung wurde durch Zugabe von einigen Tropfen 5 M Natriumacetatpuffer, pH 5.0 gestoppt. In einer entnommenen Probe wurde die Serin-Akzeptoraktivität bestimmt und mit dem Wert des analytischen Einbaus verglichen.
Das Inkubationsgemisch wurde einmal mit dem gleichen Volumen Phenol extrahiert. Die Phenolphase wurde mit Wasser nachgewaschen. Die beiden vereinigten, wäßrigen Phasen wurden unter Zugabe einiger Tropfen 5 M Natriumacetatpuffer, pH 5.0, mit Äthanol gefällt und in der Kühltruhe bei -30 ° aufbewahrt. Nach 2 Stunden wurde der Niederschlag in 1.5 ml Wasser gelöst und 3 Stunden bei 4 ° je nach der späteren Verwendung entweder gegen 0. 1 M Triäthanolamin, 10 mM $MgCl_2$, pH 4.3 (73), oder gegen 0.5 M KH_2PO_4, pH 4.6

(74), dialysiert.
Der Aminosäurerest der Seryl-tRNA wurde entweder mit einem Phenoxyacetylrest (73) oder mit einem Carbobenzoxyrest (74) substituiert. Die Herstellung des reaktiven Phenoxyacetylesters ist in (73) beschrieben. Er wurde vor jeder Derivatisierung in Isopropanol umkristallisiert. In allen Versuchen wurden die Konzentrationen der jeweiligen Vorschrift eingehalten. Die Reaktion wurde bei 0 ^{o} unter kontinuierlichem, schnellem Rühren und ständiger pH-Kontrolle durchgeführt. Der pH-Wert der Lösung wurde erst nach Zugabe des jeweiligen Reagenz auf 8.0 (73) bzw. pH 7.0 (74) eingestellt. Nach der Derivatisierung wurde das Inkubationsgemisch mit Eisessig auf pH 4.5 gebracht und anschließend sofort ohne weitere Reinigungsschritte an einer BD-Cellulose-Säule (2 x 18 cm) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit zwei Gradienten:
1. Salzgradient: 0.5 - 1.2 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, je 300 ml.
2. Äthanolgradient: Endpuffer - Endpuffer und 10 % Äthanol, je 500 ml.

Aus dem Äthanoleluat wurde die derivatisierte tRNA durch Alkoholfällung isoliert. Die N-substituierte Aminosäure wurde abgespalten (73, 74) und die tRNA wurde durch Rechromatographie an einer BD-Cellulose-Säule (1 x 10 cm) gereinigt, deren Elution mit dem oben beschriebenen Salzgradienten erfolgte.

4.3.7. Präparative Entacetylierung und analytische Bestimmung des Acetylgehalts von Serin tRNA

Bei der präparativen Entacetylierung wurden Lösungen, die 20 - 30 A_{260}-Einheiten/ml acetylierte Serin tRNA enthielten, mit dem gleichen Volumen an konzentriertem Ammoniak bei 37 ^{o} inkubiert. Nach 10 Min. wurde die Hydrolyse durch Zugabe von Eisessig (bis pH 7.0) beendet. Die tRNA wurde mit Äthanol gefällt, in 0.03 M Ammoniumformiat, pH 7.5, gelöst und nochmals mit Äthanol gefällt. tRNA-Bruchstücke, die im Verlauf der Hydrolyse entstanden waren, wurden durch Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen (1 x 10 cm) abgetrennt (Gradient vgl. 4.3.6.)

Bei der analytischen Bestimmung des Acetylgehalts wurden 2 - 3 A_{260}-Einheiten tRNA in 0.2 ml Wasser gelöst und mit 20 µl 1 N NaOH bei 37 °C inkubiert. In einem Photometer wurde die Abnahme der Extinktion bei 310 nm gemessen. Aus der Extinktionsdifferenz wurde der N^4-Acetylcytidingehalt der tRNA mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten: ε_{310} = 11 000 $M^{-1}cm^{-1}$ berechnet.
Die analytische Bestimmung wurde wahlweise auch nach folgender Vorschrift ausgeführt: 4 A_{260}-Einheiten Serin tRNA wurden in 0.1 ml 0.03 M Ammoniumformiatpuffer, pH 7.5, gelöst und mit Pankreas-RNase gespalten. Nach 1 Stunde Inkubationszeit bei 37 °C wurden 0.9 ml 1.1 N Salzsäure zugegeben. Die Extinktion dieser Probe wurde sofort bei 310 nm gemessen. Als Referenzsubstanz wurde die gleiche Serin tRNA verwendet, nachdem sie durch Ammoniakinkubation vollständig entacetyliert worden war. Der N^4-Acetylcytidingehalt wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten: ε_{310} = 17 000 $M^{-1}cm^{-1}$ aus der Extinktionsdifferenz der beiden Proben bestimmt.

4.3.8. Bestimmung der Endgruppe von Seryl-tRNA nach T1-RNase-Spaltung

50 A_{260}-Einheiten unfraktionierte tRNA wurden mit ^{3}H-Serin und 100 A_{260}-Einheiten einer $tRNA^{Ser}_{3a}$-Fraktion wurden mit ^{14}C-Serin beladen. Die gereinigten Seryl-tRNAs wurden zusammen in 1.5 ml 2 mM EDTA, 10 mM Kaliumacetatpuffer, pH 5.4, gelöst und mit 1 000 Einheiten T1-RNase zwei Stunden bei 37 °C inkubiert (67, 68). Das Hydrolysat wurde mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (1 x 25 cm) aufgezogen.
Die Säule wurde zunächst mit einem 10 mM Ammoniumformiatpuffer, pH 5.2, eluiert. Nach 275 ml wurde ein linearer Gradient angeschlossen: 0.2 - 0.4 Ammoniumformiatpuffer, pH 5.2, je 600 ml. Abschließend wurde mit 1 M Ammoniumformiatpuffer, pH 5.2, nachgewaschen. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde 1 ml jeder zweiten Fraktion in 10 ml Bray-Szintillatorgemisch pipettiert und bei diskriminierender Einstellung im Szintillationszähler gemessen.

4.3.9. Oligonucleotidanalyse

T1-RNase/PME-Spaltung von $tRNA^{Ser}$

200 - 250 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Ser}$ wurden in 2 ml Wasser gelöst und mit 2 000 Einheiten T1-RNase 2 Stunden bei 45 °C inkubiert. Der pH-Wert 7.5 wurde durch einen Autotitrator konstant gehalten. Der Verlauf der Spaltung konnte am registrierten Verbrauch der Natronlauge verfolgt werden. Anschließend wurde mit PME 2 Stunden bei 37 °C, pH 8.0 weiterinkubiert.
Die Oligonucleotide wurden durch Chromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule (1 x 50 cm), die mit drei hintereinander geschalteten Ammoniumcarbonat-Gradienten eluiert wurde, getrennt (13). Das Fraktionsvolumen betrug 5 ml.

T1-RNase-Spaltung von $tRNA^{Ser}$

20 - 30 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Ser}$ wurden in 1.5 ml Wasser gelöst und mit 250 Einheiten T1-RNase 2 Stunden bei 45 °C inkubiert (pH 7.5).
Die Oligonucleotide wurden an einer DEAE-Cellulose-Säule (0.3 x 100 cm) getrennt (63). Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0.01 - 0.3 M NaCl, 7 M Harnstoff, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, je 250 ml. Das Fraktionsvolumen betrug 1 ml. Die Flußgeschwindigkeit der Säule hing stark von der Partikelgröße der DEAE-Cellulose ab.

Isolierung der Oligonucleotide aus Säuleneluaten

Die Oligonucleotide der DEAE-Cellulose-Säule, deren Elution mit Ammoniumcarbonat erfolgte, wurden nach Zusammenspülen der Fraktionen durch Einrotieren am Vakuumrotationsverdampfer und anschließendem Eintrocknen über Phosphopentoxyd und KOH im Exsikkator isoliert und durch Papierelektrophorese gereinigt.
Zur Isolierung geringer Oligonucleotidmengen aus Harnstofflösungen wurden zwei Methoden verwendet:
1. Methode: Die Lösung der Oligonucleotide wurde 1 : 10 verdünnt

und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (0.5 x 2 cm), die mit einem 20 mM Ammoniumcarbonatpuffer, pH 8.5 äquilibriert worden war, aufgezogen (104). Der Harnstoff und das Salz wurden mit dem gleichen Puffer heruntergewaschen, ehe die Oligonucleotide mit 0.5 M Ammoniumcarbonatpuffer, pH 8.5, eluiert wurden. Aus dem Eluat wurden die Oligonucleotide, wie oben beschrieben, isoliert.

2. Methode: Die Oligonucleotide wurden als Zinksalz zusammen mit basischem Zinkacetat gefällt und mit einer 2 mM Natriumbicarbonat-Lösung, pH 8.1, mehrmals unter pH-Kontrolle gewaschen. Die Zinksalze wurden anschließend als Aminkomplexe mit 1 M Ammoniumcarbonat gelöst. Die Entfernung der Zink- und Ammoniumionen erfolgte mit Hilfe einer Kationenaustauscher-Suspension (AG 50W-X8). Das Austauscherharz wurde abfiltriert und die Oligonucleotidlösung wurde am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt (105, 63).

Papierelektrophorese

Die Papierelektrophoresen der Oligonucleotide wurden bei pH 2.7 und 3.5 durchgeführt. Die Puffer enthielten: 25 ml konz. Ameisensäure, 5 ml 0.1 M EDTA, 3 l Wasser, mit Ammoniak auf pH 2.7 eingestellt, bzw. 15 ml konz. Ameisensäure, 8 ml 0.1 M EDTA, 5 l Wasser, mit Ammoniak auf pH 3.5 eingestellt. Die Elektrophorese erfolgte 1 1/2 - 2 Stunden bei 3 000 Volt.
Die getrennten Oligonucleotide wurden durch ihre Absorptionsspektren charakterisiert, die in Wasser und in 0.02 N Salzsäure aufgenommen wurden.

Weitere Charakterisierung von Oligonucleotiden

Wenn notwendig, wurden die Oligonucleotide der T1-RNase-Spaltung entweder mit Pankreas-RNase oder mit Phosphodiesterase aus Schlangengift und alkalischer Phosphatase weitergespalten (13). 10 - 30 A_{260}-Einheiten Oligonucleotid wurden 4 - 5 Stunden bei

37 ° mit 0.02 A_{280}-Einheiten Pankreas-RNase in 0.14 ml 30 mM Ammoniumformiatpuffer, pH 7.5, inkubiert. Die Spaltprodukte wurden durch Papierelektrophorese getrennt.
0.2 - 1.5 A_{260}-Einheiten Oligonucleotid wurden in 100 µl Puffer (20 mM Ammoniumcarbonat, 1 mM $MgCl_2$) 3 - 4 Stunden bei 37 ° mit 0.3 - 0.4 Einheiten PME und 5 - 10 Einheiten PDE aus Schlangengift inkubiert. Die Trennung der Nucleoside erfolgte auf einer Dünnschichtplatte aus Cellulose mit dem Lösungsmittelsystem: $(NH_4)_2SO_4$-gesättigte Lösung/1 M NaOAc, pH 5.5/Isopropanol (40 : 9 : 1). Die Oligonucleotidflecken wurden ausgekratzt, mit Wasser eluiert, und die Nucleoside wurden spektroskopisch identifiziert.

4.3.10. Disk-Elektrophorese

Eine genaue Beschreibung der Disk-Elektrophorese findet man bei P. Philippsen (106). Es wurde das diskontinuierliche Puffersystem, Diäthylbarbitursäure/Tris-HCl-System, pH 8.9, von Richards et al. verwendet (107).
Das Trenngel enthielt 16 % Acrylamid und 1.3 % Bisacrylamid, das Sammelgel 5 % Cyanogum 41 (ein Gemisch aus einem Anteil 95 %iger Acrylamidlösung und 20 Anteilen 5 %iger Bisacrylamidlösung). Die Elektrophorese wurde bei 300 - 400 Volt und 100 mAmp. durchgeführt. Sie dauerte 6 - 7 Stunden, die Kühlung erfolgte mit Leitungswasser. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit dem gleichen Volumen einer Lösung versetzt, die 50 % Saccharose, etwas Bromphenolblau (als Referenz) und 7 M Harnstoff enthielt. Die Gele wurden mit "Stains all" (100) angefärbt. Die Densitogramme der Gele wurden bei 546 nm mit einem umgebauten Photometer PL 4 der Fa. Zeiss aufgenommen.

4.3.11. Aminoacylierung von tRNA

Analytischer Einbau

Die Akzeptoraktivität der tRNAs wurde wie in (108) bestimmt. Die Aminoacylierung erfolgte entweder mit einem Rohenzymgemisch oder

bei fraktionierter $tRNA^{Ser}$ mit der angereicherten Seryl-tRNA-Synthetase.
Das Inkubationsgemisch enthielt in 0.1 ml: 0.01 - 1.0 A_{260}-Einheiten tRNA, 0.2 A_{280}-Einheiten unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase, 1 µMol ATP, 1.5 µMol $MgCl_2$, 2.5 µMol Tris/HCl, pH 7.5 und 0.01 µMol ^{14}C-Aminosäure. Das Gemisch wurde 15 Min. bei 37 ^{o} inkubiert. Die Reaktion wurde mit kalter 5 %iger Trichloressigsäure gestoppt. Waren nur 0.01 A_{260}-Einheiten tRNA im Inkubationsansatz, so wurden 0.5 A_{260}-Einheiten ribosomale Träger-RNA zugegeben und dann erst über Glasfaser-Filter abfiltriert, dreimal mit ca. 5 ml 5 %iger Trichloressigsäure und zuletzt mit Äthanol gewaschen. Die Filter wurden 30 Min. bei 80 ^{o} getrocknet. Nach Zugabe von 5 ml Toluol-Szintillator (4 g Omnifluor auf 1 l absolutiertes Toluol) wurde die Radioaktivität im Szintillationsspektrometer gemessen. Aus den Impulsen/Min. wurde die Akzeptoraktivität in pMol/A_{260}-Einheit berechnet.
Der Einbau von ^{14}C-Adenosin wurde mit angereicherter C-C-A-Transferase durchgeführt, wie in (92) beschrieben.

Präparative Beladung

Größere tRNA-Mengen wurden mit folgendem Inkubationsgemisch aminoacyliert: 0.8 - 1.0 ml enthielten 25 - 30 A_{260}-Einheiten unfraktionierte tRNA, 0.1 ml ATP-Gemisch (0.1 M ATP, 0.15 M $MgCl_2$, 0.25 M Tris/HCl, pH 7.5), 0.1 ml radioaktive Aminosäure (^{14}C-Serin 153 bzw. 160 mCi/mM, 0.5 µMol/ml oder ^{3}H-Serin 157 bzw. 3 000 mCi/mM, 1 µMol/ml) und 50 - 100 µEinheiten unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Die Inkubationsdauer betrug 20 Min. bei 37 ^{o}. Bei angereicherter Serin tRNA mußte die Konzentration der Aminosäure verdoppelt werden, um eine vollständige Beladung unter den obigen Bedingungen zu erzielen.

Die Abtrennung von Enzym, ATP und freier Aminosäure erfolgte nach zwei Methoden:
Die Beladung wurde mit einem Tropfen 1 M Essigsäure gestoppt und mit 0.8 - 1.0 ml Phenol 30 Min. geschüttelt. Die Phasen

wurden durch Zentrifugation getrennt. Die wäßrige Phase wurde sorgfältig abpipettiert und zweimal mit peroxidfreiem Äther extrahiert. Die Aminoacyl-tRNA wurde mit 2 N Salzsäure gefällt und noch zweimal mit kalter 0.1 N Salzsäure gewaschen. Der Niederschlag wurde in 1 ml 0.05 M Natriumacetatpuffer, pH 5.0, gelöst.
In den meisten Fällen wurde das Inkubationsgemisch nach Beendigung der Reaktion auf eine Sephadex-G-25-Säule (1 x 25 cm) aufgetragen und mit einem 10 mM KH_2PO_4-Puffer, pH 5.8, eluiert. Die Aminoacyl-tRNA wurde auf diese Weise von freier Aminosäure und ATP abgetrennt.
Um die Höhe der Beladung zu bestimmen, wurde eine Probe und 1 ml Puffer in 10 ml Bray-Szintillatorgemisch (10l) pipettiert und im Szintillationszähler gemessen. Für diesen Test wurde der Elutionspuffer verwendet, in dem die Aminoacyl-tRNA später chromatographiert wurde.

Kinetische Untersuchung der Aminoacylierung von Serin tRNAs

Die Inkubationsbedingungen wurden nach Vorversuchen so gewählt, daß der Aminosäureeinbau linear von der Enzymmenge und der Inkubationszeit abhing. In 90 µl Inkubationsgemisch waren steigende $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen (0.01 - 0.15 A_{260}-Einheiten), 10 µl ATP-Gemisch und 10 µl ^{14}C-Serin (48 mCi/mM, 0.5 µMol/ml). Dieses Gemisch wurde 10 Min. bei 24 ^{o} präinkubiert. Dann wurden 12.6 µEinheiten gereinigte Seryl-tRNA-Synthetase zugegeben und 1 Min. bei 24 ^{o} inkubiert. Die Reaktion wurde sofort mit 5 %iger Trichloressigsäure gestoppt und die tRNA wurde nach Zugabe von 0.5 A_{260}-Einheiten ribosomaler Träger-RNA abfiltriert.
Bei der kinetischen Untersuchung von $tRNA_2^{Ser}$ aus Bäckerhefe, die ein unvollständiges 3'-Ende besaß, waren im Inkubationsansatz zusätzlich 10 µl CTP (1 µMol/ml) und 40 µEinheiten C-C-A-Transferase. Die Dauer der Präinkubation reichte aus, um das C-C-A-Ende vollständig zu rekonstituieren, denn $tRNA_2^{Ser}$ wurde mit einem Überschuß an Synthetase in 1 Min. vollständig beladen. Der durch analytischen Einbau erhaltene Wert der Serin-Akzeptoraktivität wurde der Berechnung der Substratkonzentration zugrunde gelegt.

4.3.12. Ribosomenbindungstest

Die Ribosomen wurden aus selbstgezüchteten E. coli B nach der Vorschrift von Gottschling et al. (109) hergestellt. Der Bindungstest der Seryl-tRNAs ans Ribosom erfolgte nach Nirenberg und Leder (81). In 0.1 ml Inkubationsgemisch waren 3 A_{260}-Einheiten Ribosomen, 0.1 - 0.3 A_{260}-Einheiten Polynucleotid, 20 µl Puffer (0.2 M Tris-Acetat, pH 7.2, 0.04 M Magnesiumacetat, 0.08 M KCl). Die verwendeten Polynucleotide und die Menge der Seryl-tRNAs sind in der Tabelle 11 angegeben. Die Inkubationsdauer betrug 30 Min. bei 20 °. Die Proben wurden über Membranfilter abgesaugt, zweimal mit obigem Puffer gewaschen (1 : 5 verdünnt) und getrocknet. Die Radioaktivität wurde nach Zugabe von 5 ml Toluolszintillatorgemisch im Szintillationsspektrometer gemessen.

4.3.13. Klon-Isolierung und Anzucht von größeren Hefemengen

Die Klon-Isolierung erfolgte aus den Hefestämmen, die die Firma Boehringer zur Herstellung des käuftlichen tRNA-Gemisches verwendet (vgl. 4.1.1.). Suspensionen von der Brauerhefe und von zwei Bäckerhefen wurden auf Agarplatten folgender Zusammensetzung ausgestrichen: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glucose und 2 % Agar-Agar (87). Die Hefen wurden bei 28 ° inkubiert. Nach 2 - 3 Tagen wurde eine Einzelkolonie abgeimpft und wieder auf eine frische Agarplatte ausgestrichen. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Nach der dritten Inkubation wurde der Zellklon auf Schrägagar übertragen. Diese Stammkultur wurde für die weiteren Versuche benutzt.

Von diesen Stammkulturen wurde eine Übernachtkultur in 50 ml Vollmedium angesetzt. Das Vollmedium (87) enthielt: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton und 2 % Glucose. Die Vorkultur wurde in einem Schüttler bei 28 ° inkubiert. Die Anzucht größerer Hefemengen erfolgte in einem Fermenter, der mit 5 l Vollmedium gefüllt war. Die Inkubation wurde unter kräftigem Rühren und starker Belüftung durchgeführt. Die Hefe wurde am Ende der

logarithmischen Wachstumsphase, die unter den angegebenen Bedingungen nach 10 - 12 Stunden erreicht wurde, geerntet, abzentrifugiert, gewogen und in der Kühltruhe bei -30 ^{o} aufbewahrt. Die Ausbeute betrug 75 - 95 g Hefe pro 5 l Kulturmedium.

4.3.14. Sporulation und Tetradenanalyse

Die drei Hefestämme wurden zunächst auf einem Präsporulationsmedium inkubiert. Das Medium (84) war zusammengesetzt aus: 0.8 % Hefeextrakt, 0.3 % Pepton, 10 % Glucose und 2 % Agar. Nach zwei Tagen wurden die Hefezellen auf ein Sporulationsmedium übergeimpft (110), das aus 1 % Kaliumacetat, 0.1 % Hefeextrakt, 0.05 % Dextrose und 2 % Agar bestand. Auf diesem Medium sporulieren die Hefestämme normalerweise nach 3 - 5 Tagen (111).
Zur Isolierung der einzelnen Sporen wurde die Zellwand der Tetrade mit Helicase abgebaut (112), ein Tropfen des Inkubationsgemisches wurde auf eine Agarplatte (Vollmedium) pipettiert und die Sporen wurden durch Mikromanipulation getrennt. Nach drei Tagen Inkubation bildeten bei zwei von zwölf Tetraden alle vier Sporen eine Zellkolonie. Diese beiden Tetraden wurden auf Schrägagar (Vollmedium) übergeimpft. Da die verwendeten Hefen heterothallisch sind, d.h. zwei Arten von Paarungstyp-Allelen, α und a, tragen können (113), wurden die durch Sporulation der Bäckerhefe Typ L erhaltenen Stämme auf ihren Paarungstyp untersucht. Inkubiert man Hefezellen mit entgegengesetztem Paarungstyp gemeinsam auf einer Agarplatte, so entstehen Zygoten, die man unter dem Mikroskop identifizieren kann (85, 86). Die haploiden Hefestämme α S288C und a D587-2A wurden in diesem Test verwendet.
Von den durch Sporulation erhaltenen Stämmen wurden größere Hefemengen wie in 4.3.13. gezüchtet. Die tRNA wurde extrahiert (89). Die Zusammensetzung der $tRNA^{Ser}$-Fraktion wurde durch Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen bestimmt.

4.3.15. Isolierung von tRNA aus Hefe

Die Isolierung der tRNA erfolgte nach der Vorschrift von Monier et al. (89).
30 - 40 g Hefe wurden in Wasser suspendiert und mit dem gleichen Volumen Phenol eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die durch Zentrifugation abgetrennte, wäßrige Phase wurde abpipettiert, mit 50 %iger Kaliumacetatlösung versetzt (ad 2%) und mit Äthanol gefällt. Der Niederschlag wurde dreimal mit je 10 ml 0.1 M NaCl, 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, digeriert. Die vereinigten wäßrigen Lösungen wurden auf eine DEAE-Cellulose-Säule (1 x 10 cm) aufgezogen, die mit 0.1 M NaCl, 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, äquilibriert worden war, und mit 250 ml 0.2 M NaCl, 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, nachgewaschen. Danach wurde die Säule mit einem linearen Gradienten eluiert: 0.2 - 1.0 M NaCl, 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, je 500 ml. Die tRNA-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und mit Äthanol gefällt. Aus 40 g Hefe wurden etwa 1 400 A_{260}-Einheiten tRNA isoliert.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Multiplizität der Serin tRNAs aus Brauer- und Bäckerhefe wurde untersucht. Für die in ihrer Sequenz bekannten Hauptkomponenten $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$ aus Brauerhefe sowie $tRNA_2^{Ser}$ aus Bäckerhefe wurden verbesserte Fraktionierungsvorschriften ausgearbeitet. Die gekaufte, unfraktionierte tRNA aus Bäckerhefe enthält die Nebenkomponente $tRNA_{3a}^{Ser}$ und die analoge tRNA aus Brauerhefe die beiden Nebenkomponenten $tRNA_{3a}^{Ser}$ und $tRNA_{3b}^{Ser}$, die in dieser Arbeit zum ersten Mal angereichert und charakterisiert wurden.

Das Verhalten der einzelnen $tRNA^{Ser}$-Komponenten bei der Chromatographie an BD-Cellulose- und RPC-4-Säulen und in Gegenstromverteilungen mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen wurde ermittelt und zusammengestellt. Eine neue Methode zur tRNA-Fraktionierung, Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen in 7 M Harnstoffpuffer, pH 3.0, wurde bei der Abtrennung und Anreicherung der $tRNA^{Ser}$-Komponenten erfolgreich verwendet. Die Elutionsprofile von 19 Aminoacyl-tRNAs aus Brauerhefe wurden mit diesem neuen Säulentyp bestimmt.

In der gekauften, unfraktionierten tRNA aus Brauerhefe kommen neben den beiden acetylierten Hauptkomponenten noch zusätzlich die entsprechenden entacetylierten Spezies, $tRNA_{1(-ac)}^{Ser}$ und $tRNA_{2(-ac)}^{Ser}$, vor. Aus dem Gemisch dieser vier Komponenten wurde $tRNA_{1(-ac)}^{Ser}$ durch Chromatographie an BD-Cellulose-Säulen in Natriumacetatpuffer abgetrennt. $tRNA_2^{Ser}$ wurde aus der $tRNA_{1,2,2(-ac)}^{Ser}$-Fraktion mit Hilfe einer BD-Cellulose-Säule in Harnstoffpuffer isoliert. Das Gemisch aus $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_{2(-ac)}^{Ser}$ konnte nicht getrennt werden. Einige Eigenschaften von $tRNA^{Ser}$-Aggregaten, die bei Trennversuchen beobachtet wurden, sind beschrieben. Die Michaelis-Konstanten der Aminoacylierung und die maximalen Beladungsgeschwindigkeiten der getrennten und angereicherten $tRNA^{Ser}$-Komponenten wurden bestimmt und verglichen.

Die Multiplizität der Serin tRNAs aus Hefe ist auf mehrere

Ursachen zurückzuführen:
Das Auftreten der multiplen $tRNA^{Ser}$-Komponenten läßt sich zum Teil durch die unterschiedlichen Serin Codons erklären. $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$ können mit ihrem Anticodon I-G-A die drei Codons U-C-U, U-C-C und U-C-A erkennen. $tRNA_{3a}^{Ser}$ und $tRNA_{3b}^{Ser}$ übersetzen in der Proteinbiosynthese das Codon A-G-C und sehr wahrscheinlich A-G-U. Eine $tRNA^{Ser}$-Spezies für U-C-G fehlt in der Bäcker- und Brauerhefe oder ist nur in geringer Menge vorhanden. Es ist möglich, daß die $tRNA_x^{Ser}$-Komponente, die in Brauerhefe gefunden wurde, mit diesem Codon spezifisch in Wechselwirkung treten kann.
Der Austausch von drei Nucleotiden zwischen $tRNA_1^{Ser}$ und $tRNA_2^{Ser}$ ist ein weiterer Grund für die beobachtete Multiplizität in der Brauerhefe.
Die Anzahl der multiplen Serin tRNAs wird in der Brauerhefe durch das Vorkommen von acetylierten und entacetylierten $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten erhöht. Die N^4-Acetylcytidingehalt dieser Spezies hängt von den Kulturbedingungen der Hefe und sehr wahrscheinlich vom Zeitpunkt der Hefeernte ab.

Methoden zur Bestimmung des N^4-Acetylcytidingehalts und zur präparativen Entacetylierung der $tRNA^{Ser}$-Hauptkomponenten wurden ausgearbeitet. Die entacetylierten $tRNA^{Ser}$-Komponenten können als Substrate für das Auffinden und die Fraktionierung des spezifischen, acetylgruppenübertragenden Enzyms dienen.

Durch die Untersuchungen an geklonter Hefe wurde nachgewiesen, daß die genetische Information für die multiplen Serin tRNAs in einem Hefestamm enthalten ist. Da die verwendeten Hefestämme polyploid waren, wurde die $tRNA^{Ser}$-Zusammensetzung zweier Tetraden der Bäckerhefe untersucht. Die durch Sporulation entstandenen Stämme, deren Genom sich um mindestens einen Chromosomensatz verringert hatte, enthielten qualitativ und quantitativ die gleichen $tRNA^{Ser}$-Komponenten wie die Stammzelle. Wahrscheinlich besitzt eine haploide Zelle des Bäckerhefestammes bereits die genetische Information für die multiplen Serin tRNAs.

6. Literaturverzeichnis

1. The Mechanism of Protein Synthesis, 34. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1969.

2. E.P. Geiduschek und R. Haselkorn, Ann. Rev. Biochem. 38 (1969) 647.

3. The Genetic Code, 31. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1966.

4. P. Lengyel und D. Söll, Bact. Rev. 33 (1969) 264.

5. J. Lucas-Lenard und F. Lipmann, Ann. Rev. Biochem. 40 (1971) 409.

6. H.G. Zachau, Angew. Chemie 81 (1969) 645.

7. N. Sueoka und T. Kano-Sueoka, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 10 (1970) 23.

8. M. Wilcox, Metabolic Regulation 5 (1971) 143.

9. R.W. Chambers, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 11 (1971) 489.

10. D. Hirsh, J. Mol. Biol. 58 (1971) 439.

11. J.D. Smith, K. Anderson, A. Cashmore, M.L. Hooper und R.L. Russell, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35 (1970) 21.

12. R.A. Gilmore, J.W. Stewart und F. Sherman, J. Mol. Biol. 61 (1971) 157.

13. H.G. Zachau, D. Dütting und H. Feldmann, Z. Physiol. Chemie 347 (1966) 212.

14. J.N. Abelson, M.L. Gefter, L. Barnett, A. Landy, R.L. Russell und J.D. Smith, J. Mol. Biol. 47 (1970) 15.

15. M. Yaniv und B.G. Barrell, Nature NB 233 (1971) 113.

16. G.R. Björk und J. Svensson, Eur. J. Biochem. 9 (1969) 207.

17. R. Stern, F. Gonano, E. Fleissner und U.Z. Littauer, Biochemistry 9 (1970) 10.

18. F.O. Wettstein und G.S. Stent, J. Mol. Biol. 38 (1968) 25.

19. M.L. Gefter und R.L. Russell, J. Mol. Biol. 39 (1969) 145.

20. M. Rabinowitz und H. Swift, Physiological Rev. 50 (1970) 376.

21. J.L. Epler, Biochemistry 8 (1969) 2285.

22. B. Accoceberry und A. Stahl, Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 (1971) 1235.

23. Y. Suyama und J. Eyer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (1967) 746.

24. C.A. Buck und M.M.K. Nass, J. Mol. Biol. 41 (1969) 67.

25. E. Knight und T. Sugiyama, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63 (1969) 1383.

26. M.M.K. Nass und C.A. Buck, J. Mol. Biol. 54 (1970) 187.

27. A. Halbreich und M. Rabinowitz, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68 (1971) 294.

28. G. Burkard, P. Guillemaut und J.H. Weil, Biochim. Biophys. Acta 224 (1970) 184.

29. B.J. Reger, S.A. Fairfield, J.L. Epler und W.E. Barnett, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67 (1970) 1207.

30. G.R. Williams und A.S. Williams, Biochem. Biophys. Res. Commun. 39 (1970) 858.

31. M.D. Bick, H. Liebke, J.H. Cherry und B.L. Strehler, Biochim. Biophys. Acta 204 (1970) 175.

32. W. DeWitt, Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 (1971) 266.

33. D. Hatfield und F.H. Portugal, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67 (1970) 1200.

34. A. Yudelevich, J. Mol. Biol. 60 (1971) 21.

35. N.H. Scherberg und S.B. Weiss, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67 (1970) 1164.

36. V. Daniel, S. Sarid und U.Z. Littauer, Science 167 (1970) 1682.

37. M. Travnicek und J. Riman, Biochim. Biophys. Acta 199 (1970) 283.

38. F. Gonano, V.P. Chiarugi, G. Pirro und M. Marini, Biochemistry 10 (1971) 900.

39. Th.S. Stewart, R.J. Roberts und J.L. Strominger, Nature 230 (1971) 36.

40. R.M. Gould, M.P. Thornton, V. Liepkalns und W.J. Lennarz, J. Biol. Chem. 243 (1968) 3096.

41. L.M. Fink, T. Goto, F. Frankel und I.B. Weinstein, Biochem. Biophys. Res. Commun. 32 (1968) 963.

42. J.S. Loehr und E.B. Keller, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61 (1968) 1115.

43. T. Lindahl, A. Adams, M. Geroch und J.R. Fresco, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57 (1967) 178.

44. P. Lebowitz, P.L. Ipata, M.H. Makman, H.H. Richards und G.L. Cantoni, Biochemistry 5 (1966) 3617.

45. K.L. Roy und D. Söll, J. Biol. Chem. 245 (1970) 1394.

46. H. Ishikura, Y. Yamada und S. Nishimura, Biochim. Biophys. Acta 228 (1971) 471.

47. H. Rogg und M. Staehelin, Eur. J. Biochem. 21 (1971) 235 und 243.

48. R. Thiebe und H.G. Zachau, Biochim, Biophys. Acta 103 (1965) 568.

49. H. Feldmann, Habilitationsschrift, Universität München 1968.

50. C.M. Connelly und B.P. Doctor, J. Biol. Chem. 241 (1966) 715.

51. K. Harbers, Doktorarbeit, Universität München 1971.

52. F.H.C. Crick, J. Mol. Biol. 19 (1966) 548.

53. F.A. Neelon, M. Molinaro, H. Ishikura, L.B. Sheiner und G.L. Cantoni, J. Biol. Chem. 242 (1967) 4515.

54. H.G. Zachau, D. Dütting, H. Feldmann, F. Melchers und W. Karau, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31 (1966) 417.

55. C.C. Emeis und S. Windisch, Z. Naturforschg. 15 b (1960) 702.

56. M. Tada, M. Schweiger und H.G. Zachau, Z. Physiol. Chem. 328 (1962) 85.

57. B.P. Doctor, Methods in Enzymology 12 A (1967) 644.

58. J. Apgar, R.W. Holley und S.H. Merrill, J. Biol. Chem. 237 (1962) 796.

59. I. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. v. Tigerstrom, E. Wimmer und G.M. Tener, Biochemistry 6 (1967) 3043.

60. J.D. Cheravil und R.M. Bock, Biochemistry 4 (1965) 1174.

61. S. Nishimura, F. Harada, U. Narushima und T. Seno, Biochim. Biophys. Acta 142 (1967) 133.

62. J.F. Weiss, R.L. Pearson und A.D. Kelmers, Biochemistry 7 (1968) 3479.

63. T. Igo-Kemenes, Doktorarbeit, München 1971.

64. P. Philippsen und H.G. Zachau, FEBS Letters 15 (1971) 69

65. H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 5 (1968) 559.

66. Handbook of Biochemistry (1968), Herausgeber: H.A. Sober, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio.

67. E. Herbert, C.J. Smith und C.W. Wilson, J. Mol. Biol. 9 (1964) 376.

68. T. Ishida und K. Miura, J. Biochem. (Tokyo) 54 (1963) 378.

69. P. Lebowitz, F.C. Dohan, H.H. Richards, F.A. Neelon und G.L. Cantoni, J. Biol. Chem. 242 (1967) 4523.

70. I.H. Maxwell, E. Wimmer und G.M. Tener, Biochemistry 7 (1968) 2629.

71. K. Nakanishi, N. Furutachi, M. Funamizu, D. Grunberger und I.B. Weinstein, J. Amer. Chem. Soc. 92 (1970) 7617.

72. R. Thiebe und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 5 (1968) 546.

73. I. Gillam, D. Blew, R.C. Warrington, M. v. Tigerstrom und G.M. Tener, Biochemistry 7 (1968) 3459.

74. R. Stern und U.Z. Littauer, Biochemistry 7 (1968) 3469.

75. H. Feldmann, D. Dütting und H.G. Zachau, Z. Physiol. Chem. 347 (1966) 236.

76. St. Kowalski, T. Yamane und J.R. Fresco, Science 172 (1971) 385.

77. S.H. Chang, C. Harmon, K. Munninger und N. Miller, FEBS Letters 11 (1970) 81.

78. H. Feldmann, H. Harring und H. Gruhl, Z. Physiol. Chemie 352 (1971) 1231.

79. T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 10 (1969) 549.

80. R. Hirsch und H.G. Zachau, Z. Physiol. Chemie 351 (1970) 563.

81. M. Nirenberg und P. Leder, Science 145 (1964) 1399.

82. M. Nirenberg, T. Caskey, R. Marshall, R. Brimacombe, D. Kellogg, B. Doctor, D. Hatfield, J. Levin, F. Rottman, S. Pestka, M. Wilcox und F. Anderson, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31 (1966) 11.

83. H.G. Zachau, D. Dütting, H. Feldmann, F. Melchers und W. Karau, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31 (1966) 417.

84. R.R. Fowell und M.E. Moorse, J. appl. Bact. 23 (1960) 53.

85. N.J. Palleroni, Phyton, B. Aires, 16 (1961) 117.

86. S.Y. Chen. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris 230 (1950) 1897.

87. G.R. Fink, Methods in Enzymology 17 A (1970) 59.

88. Z. Ohashi, K. Murao, T. Yahagi, D.L v. Minden, J.A. McCloskey und S. Nishimura, Biochim. Biophys. Acta, im Druck.

89. R. Monier, M.L. Stephenson und P.C. Zamecnik, Biochim. Biophys. Acta 43 (1960) 1.

90. A.M. Michelson, J. chem. Soc. 1959, 3655.

91. R. Rigler, E. Cronvall, R. Hirsch, U. Pachmann und H.G. Zachau, FEBS Letters 11 (1970) 320.

92. H. Overath, F. Fittler, K. Harbers, R. Thiebe und H.G. Zachau, FEBS Letters 11 (1970) 289.

93. K. Takahashi, J. Biochem. (Tokyo) 49 (1961) 1.

94. M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 24 (1940) 15.

95. R.J. Hilmoe, persönliche Mitteilung an H.G. Zachau.

96. A. Garen und C. Levinthal, Biochim. Biophys. Acta 38 (1960) 470.

97. F. Melchers, D. Dütting und H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta 108 (1965) 182.

98. W.E. Razzell, Methods in Enzymology 6 (1963) 236.

99. J.D. Mandell und A.D. Hershey, Anal. Biochem. 1 (1960) 66.

100. A.E. Dahlberg, C.W. Dingman und A.C. Peacock, J. Mol. Biol. 41 (1969) 139.

101. G.A. Bray, Anal. Biochem. 1 (1960) 279.

102. R. Thiebe, Doktorarbeit, Köln 1965.

103. J.C. Turner, Internation Journal of Applied Radiation and Isotops 19 (1968) 557.

104. G.W. Rushizky und H.A. Sober, Biochim. Biophys. Acta 55 (1962) 217.

105. K. Daneck, G. Weimann und F. Cramer, Experientia 21 (1965) 417.

106. P. Philippsen, Doktorarbeit, München 1971.

107. E.G. Richards, J.A. Coll und W.B. Gratzer, Anal. Biochem. 12 (1965) 452.

108. H.G. Zachau, in: Methoden der enzymatischen Analyse (Hrsg. H.U. Bergmeyer), 2. Auflage, Bd. 2, Verlag Chemie, Weinheim, 1970.

109. H. Gottschling und H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta 103 (1965) 418.

110. R.R. Fowell, Nature 170 (1952) 578.

111. R.R. Fowell in A.H. Rose und J.S. Harrison, The Yeasts, Vol. 1 (1969) 303, Acad. Press N.Y.

112. J.R. Johnston und R.K. Mortimer, J. Bact. 78 (1959) 292.

113. C.C. Lindegren und G. Lindegren, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 29 (1943) 306.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
iA	N-6-Isopentenyladenosin
BD-	benzoylierte Diäthylaminoäthyl-
C	Cytidin
m^5C	5-Methylcytidin
ac^4C	N^4-Acetylcytidin
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
G	Guanosin
pGp	Guanosin-3',5'-diphosphat
Gm	2'-O-Methylguanosin
$m_2^2G>p$	Cyclophosphat der Dimethylguanylsäure
I	Inosin
MASA	Methyliertes Albumin, niedergeschlagen auf Kieselsäure
PDE	Phosphodiesterase aus Schlangengift
PME	Phosphomonoesterase
mRNA	Matrizen-Ribonucleinsäure
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
$tRNA^{Ser}$	Serin-spezifische tRNA (und entspr. andere)
$tRNA^{Ser}_{1\,(-ac)}$	am Cytidin Nr. 12 entacetylierte $tRNA^{Ser}_1$
$tRNA^{Ser}_{1,2,2\,(-ac)}$	Gemisch aus $tRNA^{Ser}_1$, $tRNA^{Ser}_2$ und $tRNA^{Ser}_{2\,(-ac)}$
$tRNA^{Phe}$ (HCl)	$tRNA^{Phe}$ nach Herausspalten der Y-Base durch Säurebehandlung
RNase	Ribonuclease
R_{Up}	Quotient aus der elektrophoretischen Beweglichkeit eines Oligo- oder Mononucleotids und der von Up

T	Ribo-Thymidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uridin
Um	2'-O-Methyluridin
hU	Dihydrouridin
Poly(U_1,C_1)	Polynucleotid aus Uridyl- und Cytidylsäure mit einem statistischen Verhältnis von 1 : 1 (und entspr. andere)
ψ	Pseudouridin
Y	Nucleosid neben dem Anticodon von $tRNA^{Phe}$

Lebenslauf

Am 8. März 1942 wurde ich als viertes Kind des Volksschullehrers Josef Kruppa und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Sabe, in Kranzdorf, Kreis Neustadt (Oberschlesien), geboren. Im Herbst 1949 übersiedelte meine Familie nach Schmidt, Kreis Monschau, wo ich im Oktober desselben Jahres eingeschult wurde. Von 1953 bis 1962 besuchte ich das Städt. Naturw. Gymnasium in Düren und legte im März 1962 an dieser Schule die Reifeprüfung ab.

Im Mai 1962 immatrikulierte ich mich an der Freien Universität Berlin für das Hauptfach Chemie, wo ich im Februar 1965 die Vordiplomprüfung bestand. Im Sommersemester 1965 studierte ich an der Universität Tübingen und ab Wintersemester 1965/66 an der Universität München. Im Juli 1967 legte ich das Hauptdiplomexamen ab und erhielt am 31. August 1968 das Diplom für Chemie.

Die Diplomarbeit und Doktorarbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie an der Universität München unter der Anleitung von Professor Dr. H.G. Zachau angefertigt.